

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КРИСЮК ІРИНА ПАВЛІВНА

УДК 616-006.04-06-085:577.112.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПОРУШЕННЯ ТА ЗАСОБИ КОРЕКЦІЇ МЕТАБОЛІЗМУ АЛЬДЕГІДІВ
ЗА УМОВ РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЙ РІЗНОГО ГЕНЕЗУ**

03.00.04 – біохімія

Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

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

_____Крисюк І. П.

Науковий керівник: **Дробот Людмила Борисівна**, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2020

АНОТАЦІЯ

Крисюк І. П. Порухення та засоби корекції метаболізму альдегідів за умов розвитку патологій різного генезу – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.04 «Біохімія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Альдегіди – органічні сполуки, що містять карбонільні групи, утворюються у процесі метаболізму і залежно від їх концентрації можуть відігравати регуляторну роль або виявляти токсичні властивості. Завдяки своїй високій реакційній здатності численні альдегіди екзогенного походження мають протеїномодифікувальні властивості. До таких модифікацій протеїнів відносять їх глікування, процес який відбувається в організмі постійно з невеликою швидкістю, але інтенсифікується за патологічних станів таких як гіперглікемія, гострі і хронічні запальні процеси та старіння. При цьому альдегіди можуть конкурувати між собою за вплив на ензими, рецептори, структурні протеїни, нуклеїнові кислоти та інші об'єкти-мішені, демонструючи підсилення або зменшення ефекту їх комбінованої дії. Це призводить до зростання рівня постсинтетичних модифікацій протеїнів, і, як наслідок, до різноманітних модифікацій біологічних структур та модулювання їх активності, утворення невластивих для організму протеїнів, які, в свою чергу можуть бути причиною та наслідком багатьох захворювань. Так, в патогенезі цукрового діабету альдегіди беруть участь у формуванні кінцевих продуктів перикисного окиснення ліпідів (КГЛ) та глікування протеїнів (КПГ), що призводить до пошкодження β -клітин підшлункової залози. Інша патологія, яку пов'язують з оксидативним стресом, рабдоміоліз, за якого відбувається пошкодження скелетної мускулатури з вивільненням вмісту міоцитів в кровообіг, що спричиняє, в тому числі, мітохондрійну дисфункцію, пероксидацію нуклеїнових кислот, ліпідів і протеїнів. Всі ці процеси, в свою чергу, індукують підвищення рівня альдегідів і формування гіперкарбонільного стану. З іншого боку, зниження фізіологічного рівня

альдегідів в організмі також призводить до драматичних наслідків. До таких патологічних станів відносять латиризм, який є формою незворотного спастичного парапарезису, що не прогресує, пов'язаний з погано зрозумілими дегенеративними змінами спинного мозку. Встановлено, що до розвитку латиризму призводить тривале надмірне споживання (монодієта) горошку сійного *Lathyrus sativus* з високим вмістом токсичної сполуки β -амінопропіонітрилу, яка блокує утворення альдегідних груп, необхідних для посттрансляційного зшивання колагенових структур. Нові дослідження з MRC Cancer Unit показали, що альдегіди можуть сприяти розвитку онкологічного процесу, руйнуючи захисні механізми, які запобігають мутаціям у генах людини. Згідно даних Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я 70% летальних випадків припадає на ускладнення, які є наслідком хронічних захворювань, таких як цукровий діабет, атеросклероз, остеоартрози, нефропатії, септичні стани, колагенози, гепатити, катаракта, онкозахворювання, кардіоваскулярні, легеневі, нейродегенеративні хвороби (Альцгеймера, Паркінсона тощо), в розвитку яких реакційноздатні альдегіди відіграють важливу роль, але 80% цих смертей є передчасними і їм можна було б запобігти. Тому подальше вивчення механізмів утворення та пошук нових засобів для зменшення патологічних наслідків гіперпродукування альдегідів є актуальним завданням сучасної біохімії.

Враховуючи сказане, метою даної дисертаційної роботи було з'ясувати особливості утворення аддуктів альдегідів з протеїнами в дослідах *in vitro* та розвитку гіпер/гіпокарбонільного стану в організмі тварин, а також розробити засоби корекції цих станів. Відповідно до цієї мети були поставлені наступні завдання: 1) в дослідах *in vitro* порівняти аддуктоутворювальні властивості низки альдегідів за їх дії на препарати лізину, альбуміну та пептиди колагенової природи; 2) на моделі гліцерол-стимульованого рабдоміолізу з'ясувати особливості протікання гіперкарбонільного стану та можливість його корекції; 3) на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету дослідити можливість корекції гіперкарбонільного стану розробленою комплексною дієтичною добавкою; 4)

на моделі латиризму, індукованого субхронічним введенням хелатора альдегідів та інгібітора альдегідоутворювальних ензимів, семікарбазиду, вивчити особливості протікання гіпокарбонільного стану; 5) на моделі карциноми легені Льюїс у мишей дослідити можливість модулювання активності альдегідоутворювальних ензимів препаратом, розробленим на основі модифікованого креатину.

У досліджах *in vitro* проведено порівняльне дослідження модифікувальної дії альдегідів, що утворюються ендогенно в організмі людини і тварин на альбумін сироватки крові людини, лізин та желатину. Для цього досліджували флуоресцентні властивості аддуктів, вміст протеїнових карбонільних груп, перерозподіл молекулярної маси протеїну після інкубування розчину обраних протеїнів з альдегідами: рибозою, гліюксалем, метилгліюксалем та формальдегідом (20 мМ кожний) та за їх комбінування в 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37°C у темряві протягом 30 діб. Флуоресценцію біологічних зразків ($\lambda_{\text{ex}}=(300-420)$ нм, $\lambda_{\text{em}}=(420-600)$ нм) використовували як прогностичний маркер рівня КППГ. Аналіз спектрів збудження флуоресценції досліджуваних протеїнів за дії альдегідів виявив відмінності у хімічній структурі утворених аддуктів, про що свідчать різні спектральні характеристики флуоресценції: максимум довжини хвилі та форма спектрів. За умов комбінування різних альдегідів утворюються нові за хімічною будовою аддукти, які відрізняються від таких, що формуються за впливу кожного з ефекторів окремо. Отримані дані демонструють залежне від часу інкубації зниження інтенсивності флуоресценції утворених аддуктів, що може свідчити про перетворення їх у нефлуоресцентні похідні. Крім того, було продемонстровано, що в процесі модифікації альбуміну, лізину та желатини альдегідами в ізольованому модельному середовищі відбувається утворення протеїнових карбонільних груп, при цьому швидкість та спрямованість цього процесу залежить від хімічної будови альдегідів. Під впливом альдегідів в молекулах досліджуваних протеїнів відбувається утворення міжмолекулярних зшивок, що призводить до перерозподілу

молекулярної маси у бік її збільшення, тобто формування високомолекулярних полімерів цих протеїнів. Цей процес також залежав від часу та хімічної будови ефектору. Аналіз отриманих даних показав, що динаміка утворення СО-груп та «важких» полімерів протеїнів під дією кожного з альдегідів була протилежною. Враховуючі отримані дані щодо здатності альдегідів активно вступати в реакцію з відновленими тіолами (цистеїном, глутатіоном) та аміногрупами протеїнів, нами було розроблено дієтичну добавку, яка містила гліцин, лізин та N-ацетил-L-цистеїн (N-АЦ), для нормалізації рівня ендогенних альдегідів та зменшення відповідних постсинтетичних протеїнових модифікацій за умов гіперпродукування альдегідів в організмі людини і тварин при патологічних станах. Запропонована добавка достовірно знижувала вміст формальдегіду у гомогенаті печінки *in vitro*.

За умов моделювання експериментального рабдоміолізу у щурів внутрішньом'язевим одноразовим введенням тваринам 50% водного розчину гліцеролу відбувається розрив міоцитів з вивільненням у кров'яне русло їх внутрішньоклітинного вмісту з наступною появою в плазмі незв'язаного лабільного феруму, який спричиняє потужний окиснювальний стрес. Визначені біохімічні показники в тканинах піддослідних тварин свідчили про характерні ознаки гіперкабонільного стану: підвищення загального вмісту альдегідів у тканині печінки, вмісту протеїнових СО-груп в сироватці крові в 2,8 рази, в тканині печінки – в 2,8 рази, вмісту ТБК-активних продуктів в печінці - в 1,6 рази, а також зростання в нирці, органі-мішені патологічних змін при рабдоміолізі, активності формальдегідутворювального ензиму семікарбазидчутливої амінооксидази (САО) в 3,5 рази. Водночас, двократне зниження каталазної активності каталази вказувало на збільшення чутливості тканини нирки до агресивної дії метаболітів, що утворюються за даних умов. Для зниження ознак окиснювального стресу, тваринам, через 1 добу після ін'єкування гліцеролу, перорально вводили 20% розчин тіолвмісної сполуки N-АЦ. При цьому спостерігали зниження загального вмісту альдегідів у печінці в 1,6 рази, вмісту протеїнових СО-груп у сироватці крові в 1,8 рази, а

в тканині печінки – в 1,7 рази, вмісту ТБК-позитивних продуктів в печінці – практично до рівня контролю, тоді як активність і-NO-синтази - 1,35 рази. Встановлено також, що в нирці активність каталази відновлювалась до рівня контролю, тоді як активність САО знижувалась у 1,8 рази. Отримані дані показали ефективність застосованої добавки, що може бути зумовлено, як зв'язуванням лабільного заліза в залізо-сірчаний комплекс, так і здатністю продуктів метаболізму N-АЦ (цистин, цистеїн) утворювати ковалентні комплекси з альдегідами. Таким чином, вищенаведені результати дозволяють стверджувати, що активні карбонільні сполуки є не тільки продуктами оксидативного стресу, але й промоторами цього процесу.

На моделі стрептозотонин-індукованого цукрового діабету (СТЦД) у щурів, реєстрували підвищення загального вмісту альдегідів в печінці в 2,4 рази порівняно з контролем, що свідчить про розвиток гіперкарбонільного стану. Як маркер інтенсивності формування КПП використано вміст карбоксиметиллізину (КМЛ). Було показано, що цей показник у плазмі крові тварин з СТЦД зростає в 2,5 рази порівняно з контролем. Одночасно спостерігалось зростання показників оксидативного стресу. Вміст протеїнових СО-груп в плазмі крові збільшився в 4,5 рази, в тканині печінки – в 4 рази, вміст ТБК-продуктів в печінці підвищився удвічі, рівень низькомолекулярних відновлених SH-метаболітів (цистеїн, глутатіон, тіосульфат та інш.) знизвся на 52 %. Застосування комплексної дієтичної добавки на моделі СТЦД призвело до зниження (нормалізації) низки показників: загального вмісту альдегідів у печінці - в 2,8 рази (до рівня контролю), КМЛ в сироватці крові - на 54%, вмісту протеїнових СО-груп в сироватці крові - на 47%, а в тканині печінки – на 58%, вміст ТБК-позитивних продуктів - на 42%, при цьому рівень SH-груп у структурі низькомолекулярних сполук у печінці відновлювався (зростав) у 1,7 рази. Зміни останнього показника можуть також свідчити про безпосередню участь ендогенних альдегідів у регулюванні пулу тіоловмісних сполук. Таким чином, розроблена комплексна дієтична добавка ефективно знижувала

патогенетичні наслідки гіперкарбонільного стану в тканинах піддослідних тварин за умов стрептозоточин-індукованого діабету.

Моделювання у щурів експериментального латиризму шляхом хронічного введення тваринам з їжею семікарбазиду (акцептора альдегідів) протягом 45 діб призвело до суттєвої зміни темпів їх росту, зменшення маси тіла та диспропорції ваги певних органів (масовий коефіцієнт (%*10) нирки, мозку та сім'яників дослідних щурів був вищим за норму, а для тимусу цей показник зменшився, що вказує на наявність у дослідних щурів стресового стану). Рентгенологічне дослідження показало чіткі зміни в архітектоніці скелету та різні структурні зміни як у губчастій, так і в компактній речовині кісткової тканини щурів, що отримували семікарбазид, в порівнянні з інтактними тваринами. Встановлено, що виявлені зміни відбуваються за рахунок гіпокальціємії кісток (зниження кальцію в 1,89 рази у стегновій кістці) та зростання активності лужної фосфатази в сироватці крові в 1,74 рази, підвищення розчинності глікозаміногліканів та колагену у сполучній тканині, результатом чого може бути зниження ступеня міжмолекулярного зшивання фібрил цього протеїну. За результатами біохімічних досліджень тканин піддослідних щурів продемонстровано зменшення значень низки показників: концентрації альдегідів у печінці - в 1,76 рази, активності основного ензиму, який відповідає за формування структури позаклітинного матриксу шляхом утворення аллізину та подальших його перетворень, лізілоксидази (ЛО), в серці – в 4,8 рази, активності САО в легені – в 1,2 рази, а також зростання активності глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази (АДГЗ) в печінці та мозку в 2 та 1,5 рази, відповідно, що свідчить про розвиток гіпокарбонільного стану.

Відомо, що для онкологічних захворювань різного тканинного походження характерним є зростання активностей альдегідоутворювальних ензимів, чутливих до семікарбазиду (САО, ЛО, діамінооксидази (ДАО)), що корелюють з прогресією пухлинного росту. Тому, беручи до уваги експериментальні дані, отримані на моделі латиризму, було розроблено дієтичну добавку для застосування у комплексному лікуванні онкологічних

захворювань на основі модифікованого 0,015% гіпохлоритом натрію креатину, розчин якого містить низьку концентрацію семікарбазиду (0,00024%). Для проведення досліджень було сформовано 6 експериментальних груп. Тваринам 3 груп було привито карциному легені Льюїс (КЛЛ). Група інтактних тварин та група тварин з КЛЛ отримували немодифікований креатин, ще одна пара таких груп отримувала добавку на основі модифікованого креатину. Внаслідок метастазування у тварин з КЛЛ спостерігалось збільшення маси органу-мішені – легені, з одночасним підвищенням активності ЛО. Вживання інтактними тваринами як креатину, так і модифікованого креатину не супроводжувалось змінами у рівні активності ЛО, тоді як модифікований креатин індукував зростання рівня експресії ензиму. Прийом тваринами з КЛЛ комплексної добавки маса легені, маса пухлини та кількість метастазів зменшувались пропорційно зі зменшенням активності та рівня експресії ЛО. Таким чином, застосування препарату на основі модифікованого креатину, як необоротного інгібітора мідь-вмісних амінооксидаз, нормалізувало морфометричні і біохімічні показники досліджених тканин на моделі карциноми легені Льюїс.

Проведений комплекс експериментальних робіт засвідчив існування особливостей модифікації альбуміну сироватки крові людини, колагену, лізину за участі альдегідів, що утворюються ендогенно в організмі людини і тварин, та їх комбінацій *in vitro*, системну участь альдегідів у молекулярних механізмах розвитку оксидативно-карбонільного стресу і, як наслідок, патогенезу низки захворювань на тваринних моделях як за умов посилення (рабдоміоліз, стрептозотоцин-індукований діабет, карцинома легені Льюїс), так і пригнічення (латиризм) їх продукування. Зазначені дослідження лягли в основу розробки методів зниження токсичного впливу альдегідів за допомогою дієтичних добавок, на які були отримані відповідні патенти.

Ключові слова: альдегіди, діабет, рабдоміоліз, латиризм, карцинома легені Льюїс, гіперпродукування альдегідів, гіпопродукування альдегідів

SUMMARY

Krysiuk I. P. Disorders and means of correction of aldehydes metabolism under conditions of pathologies of different genesis - - Qualification scientific work on the rights of manuscript.

Thesis for a candidate degree in biological sciences (doctor of philosophy) in specialty 03.00.04 "Biochemistry". - Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, 2020.

Aldehydes, organic compounds containing carbonyl groups, are formed during metabolism and can play a regulatory role or exhibit toxic properties depending on their concentration. Many aldehydes of exogenous origin have protein-modifying properties due to their high reactivity. Such modifications of proteins include their glycation, a process that occurs in the body constantly at a low rate, but intensifies in pathological conditions such as hyperglycemia, acute and chronic inflammatory processes and aging. In this case, aldehydes can compete with each other for effects on enzymes, receptors, structural proteins, nucleic acids and other target objects, showing an increase or decrease in the effect of their combined action. This leads to an increase in the level of postsynthetic modifications of proteins, and, as a consequence, to various modifications of biological structures and modulation of their activity, the formation of uncharacteristic proteins, which, in turn, can be the cause and consequence of many diseases. Thus, in the pathogenesis of diabetes, aldehydes are involved in the formation of end products of lipid peroxidation (AGLs) and protein glycation (AGEs), which leads to damage of β -cells of the pancreas. Another pathology associated with oxidative stress is rhabdomyolysis, in which skeletal muscle damage occurs with the release of myocytes content into the bloodstream, causing mitochondrial dysfunction, peroxidation of nucleic acids, lipids and proteins, which in turn induces an increase in the level of aldehydes that lead to the development of hypercarbonyl state. On the other hand, low physiological *levels of aldehydes* in the *body* also lead to dramatic consequences. Such pathological conditions include lathyrism, which is a form of irreversible non-progressive spastic paraparesis associated with poorly understood degenerative changes in the

spinal cord. It has been established that long-term excessive consumption (monodiet) of chicken peas *Lathyrus sativus* with a high content of the toxic compound β -aminopropionitrile, which blocks the formation of aldehyde groups required for posttranslational crosslinking of collagen structures, leads to the development of lathyrism. New research from the MRC Cancer Unit has shown that aldehydes can promote carcinogenesis by destroying defense mechanisms that prevent accumulation of mutations in human genes. According to the World Health Organization, 70% of deaths are due to complications resulting from chronic diseases such as diabetes, atherosclerosis, osteoarthritis, nephropathy, septic conditions, collagenosis, hepatitis, cataracts, cancer, cardiovascular, pulmonary, neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, etc.), in the development of which reactive aldehydes play an important role, whereas 80% of these cases can be prevented. Therefore, further study of the mechanisms of formation and the search for new means to reduce the pathological consequences of hyperproduction of aldehydes is an urgent task of modern biochemistry.

Given the above, the aim of this dissertation was to elucidate the peculiarities of the formation of aldehyde adducts with proteins in *in vitro* experiments and the development of hyper/hypocarbonyl state in animals, as well as to develop means of correction of these conditions. In accordance with this goal, the following tasks were set: 1) in *in vitro* experiments to compare the adductive properties of a number of aldehydes by their effect on such compounds as lysine, albumin and peptides of collagen nature; 2) on the model of glycerol-stimulated rhabdomyolysis to find out the peculiarities of the hypercarbonyl state and the possibility of its correction; 3) on the model of streptozotocin-induced diabetes to investigate the possibility of correction of the hypercarbonyl state by developed complex dietary supplement; 4) on the model of lathyrism induced by subchronic administration of an aldehyde chelator and an inhibitor of aldehyde-forming enzymes, semicarbazide, to study the peculiarities of the hypocarbonyl state; 5) on the model of *Lewis lung carcinoma* in mice to investigate the possibility of modulating the activity of aldehyde-forming enzymes with a drug developed on the basis of modified creatine.

Comparative study of the modifying effects of aldehydes, formed endogenously in humans and animals, on human serum albumin, lysine and gelatin was performed in *in vitro* experiments. For this purpose, we investigated the fluorescent properties of adducts, the content of protein carbonyl groups, the redistribution of the molecular weight of the proteins studied after incubation with aldehydes: ribose, glyoxal, methylglyoxal and formaldehyde (20 mM each) and their combination in 0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.4), containing 0.02% sodium azide, at 37° C in the dark for 30 days. Fluorescence of biological samples ($\lambda_{\text{ex}}=(300-420)$ nm, $\lambda_{\text{em}}=(420-600)$ nm) was used as a prognostic marker of AGEs level. Analysis of fluorescence excitation spectra after aldehydes action on the samples revealed differences in the chemical structure of the formed adducts, as evidenced by different spectral characteristics of fluorescence: the maximum wavelength and shape of the spectra. Under the conditions of different aldehydes combining, new chemical adducts were formed, which differed from those formed under the influence of each of the effectors separately. The obtained data showed a time-dependent decrease in the fluorescence intensity of the formed adducts, which may indicate their conversion into non-fluorescent derivatives. In addition, it was demonstrated that in the process of albumin, lysine and gelatin modification with aldehydes in an isolated model medium, the formation of protein carbonyl groups occurred, and the speed and direction of this process depended on the chemical structure of aldehydes. Under the influence of aldehydes, in the molecules of the studied proteins the formation of intermolecular crosslinks took place, which led to a redistribution of molecular weight in the direction of its increase, ie the formation of high molecular weight polymers of these proteins. This process also depended on the time and chemical structure of the effector. Analysis of the obtained data showed that the dynamics of CO-groups and “heavy” protein polymers formation under the action of each of the aldehydes was opposite. Taking into account the data obtained on the ability of aldehydes to actively react with reduced thiols (cysteine, glutathione) and amino groups of proteins, we have developed a dietary supplement containing glycine, lysine and N-acetyl-L-cysteine to normalize the levels of endogenous aldehydes and reduce the corresponding postsynthetic protein

modifications in pathological conditions associated with hyperproduction of aldehydes. The proposed additive significantly reduced the content of formaldehyde in the liver homogenate *in vitro*.

Under experimental rhabdomyolysis in rats caused by intramuscular single administration of 50% glycerol solution to animals, there was a rupture of myocytes with release of their intracellular contents into a blood-stream followed by the appearance of unbound labile iron (III) in the plasma, which causes a strong oxidative stress. Determined biochemical parameters in the tissues of experimental animals indicated the characteristic signs of hypercarbonil state: increase of the total content of aldehydes in the liver tissue, 2.8 –fold elevation in protein CO groups quantity in the serum and liver tissue, 1.6-fold elevation of TBA-active products concentration in the liver, 3.5-fold increase in the activity of the formaldehyde-forming enzyme semicarbazide-sensitive amino oxidase (SSAO) in the kidney, the targeted organ of pathological changes under rhabdomyolysis, whereas 2-fold decrease in the catalytic activity of catalase in kidney indicated an increase in the sensitivity of the tissue to the aggressive action of metabolites formed under these conditions. To reduce the signs of oxidative stress, animals were orally injected with 20% thiol-containing compound N-acetyl-L-cysteine (NAC) solution 1 day after glycerol injection. There was 1.6-fold decrease in the total content of aldehydes in the liver, 1.8-fold and 1.7-fold reduction in CO groups quantity in serum and liver tissue, respectively, whereas TBA-positive products concentration in the liver returned almost to the level of control, and activity of iNOS dropped by 1.35 times. It was also found that in the kidney catalase activity was restored to the level of control, while the activity of SSAO was reduced by 1.8 times. The data obtained demonstrated the effectiveness of used additive that may be due to binding of labile iron in the iron-sulfur complex, and the ability of the products of NAC metabolism (cystine, cysteine) to form covalent complexes with aldehydes. Thus, the above results indicate that the active carbonyl compounds are not only products of oxidative stress, but also promoters of this process.

In a model of streptozotocin-induced diabetes mellitus (STDD) in rats, a 2.4-fold increase in total liver aldehydes was revealed compared to control, indicating

the development of a hypercarbonyl state. Carboxymethyllysine (CML) content was used as a marker of AGEs formation intensity. It was shown that this indicator in the blood plasma of animals with STCD increased 2.5 times compared with the control. The content of protein CO groups in blood plasma increased by 4.5 times, and in liver tissue – by 4 times, the content of TBA products in the liver was doubled, whereas the level of low molecular weight reduced SN metabolites (cysteine, glutathione, thiosulfate, etc.) decreased by 52%. In the model of STCD, the use of a complex dietary supplement led to a decrease (normalization) of a number of indicators: the total content of aldehydes in the liver dropped 2.8 times (to the control level), and CML in serum - by 54%, the content of protein CO groups in serum reduced by 47%, and in the liver tissue - by 58%, and the content of TBA-positive products declined by 42%. Wherein, the level of SH-groups in the structure of low molecular weight compounds in the liver was restored (increased 1.7 times). Changes in the latter may also indicate a direct involvement of endogenous aldehydes in the regulation of the pool of thiol-containing compounds. Thus, the developed complex dietary supplement effectively reduced the pathogenic consequences of the hypercarbonyl state in the tissues of experimental animals under conditions of streptozotocin-induced diabetes.

Simulation of experimental lathyrism in rats by chronic administration of semicarbazide (aldehyde acceptor) to animals for 45 days led to a significant change in their growth rate, weight loss and weight disproportion of certain organs. Mass ratio (% * 10) of the kidney, brain and testes of experimental rats was higher than normal, and for the thymus, this value decreased, indicating the development of stress state in experimental rats). X-ray examination showed clear changes in skeletal architecture and various structural changes in both the spongy and compact bone tissue of semicarbazide-treated rats compared with intact animals. This was due to bone hypocalcemia (1.89-fold decrease in femoral calcium) and increase in serum alkaline phosphatase activity (1.74-fold), increased solubility of glycosaminoglycans and collagen in connective tissue, which may be associated with a decrease in the degree of intermolecular crosslinking of fibrils of this protein. According to the results of biochemical studies of experimental rats

tissues, it was showed a decrease in a number of indicators: concentration of aldehydes in the liver dropped 1.76 times, the activity of the main enzymes responsible for the structural organization of extracellular matrix (through the formation of allysine and its subsequent transformations), lysyl oxidase (LOX), in the heart diminished by 4.8 times, , SSAO activity in the lungs reduced 1.2 times, as well as an increase in glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in the liver and brain in 2 and 1.5 times, respectively, indicating the development of a hypocarbonyl state.

It is known that cancer diseases of different tissue origins are characterized by an increase in the activities of aldehyde-forming enzymes sensitive to semicarbazide (SSAO, LOX, diamine oxidase (DAO)), which correlate with the progression of tumor growth. Therefore, taking into account the experimental data obtained on the model of lathyrism, a dietary supplement was developed for use in the complex treatment of cancer based on modified with 0.015% sodium hypochlorite creatine, the solution of which contains a low concentration of semicarbazide (0.00024%). For experimental studies, 6 experimental groups were formed. Animals of 3 groups were injected with Lewis lung carcinoma cells (LLC). One group of intact animals and animals with LLC received unmodified creatine, another pair of such groups received a supplement based on modified creatine. In group of tumor-bearing mice, there was an increase in the mass of the target organ - the lungs, due to metastases appearance, with a simultaneous increase in LOX activity. The use of both creatine and modified creatine by intact animals was not accompanied by changes in the level of LOX activity, whereas modified creatine induced an increase in the level of enzyme expression. Taking of complex supplement by animals with LLC resulted in a decrease in lung mass, tumor mass and number of metastases in proportion to a decrease in LOX activity and its expression level. Thus, the use of the drug based on modified creatine, as an irreversible inhibitor of copper-containing amino oxidases, normalized the morphometric and biochemical parameters of the studied tissues in the model of Lewis lung carcinoma.

The complex of experimental works testified to the existence of peculiarities of modification of human serum albumin, collagen, lysine with the participation of aldehydes formed endogenously in humans and animals, and their combinations *in vitro*, systemic participation of aldehydes in molecular mechanisms of oxidative-carbonyl stress and, as a consequence, pathogenesis of a number of diseases in animal models both under conditions of amplification (rhabdomyolysis, streptozotocin-induced diabetes, Lewis lung carcinoma) and suppression (lathyrism) of their production. These studies formed the basis for the development of approaches to reduce the toxic effects of aldehydes with dietary supplements, for which the relevant patents have been obtained.

Key words: aldehydes, diabetes, rhabdomyolysis, lathyrism, Lewis lung carcinoma, hyperproduction of aldehydes, hypoproduction of aldehydes

Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації:

1. Володіна Т.Т., Дзвонкевич Н.Д., Петрунь Л.М., Крисюк І.П., Попова Н.М., Шандренко С.Г., Дмитренко М.П. Зміни властивостей колагену, активності лізилоксидази при латиризмі. *Фізіологічний журн.* 2011;**57**(3):62-68.
2. Токарчук К.О., Крисюк І.П., Капустяненко Л.Г., Шандренко С.Г. Роль альдегідів у розвитку оксидативного стресу в щурів з гліцерол-стимульованим рабдоміолізом і стрептозотоцин-індукованим діабетом. *Біологічні студії/Studia Biologica.* 2014;**8**(1):73-84.
3. Крисюк І.П., Кнауб А.Я., Шандренко С.Г. Порівняння модифікуючої дії біоактивних альдегідів на альбумін людини. *Укр. біохім. журн.* 2014; **86**(2):68-78.
4. Крисюк І.П., Дзвонкевич Н.Д., Володіна Т.Т., Попова Н.Н., Шандренко С.Г. Вплив біоактивних альдегідів на желатину. *Укр. біохім. журн.* 2015;**87**(2):80-88.
5. Tokarchuk K., Krysiuk I., Shandrenko S. Changes of Carbonyl Stress Parameters in Rats with Diabetes and Rhabdomyolysis. *International Journal of Biochemistry Research & Review.* 2015;6(4):151-159.
6. Krysiuk I.P., Horak I.R., Shandrenko S. G. The approach for express spectrometric determination of the reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) content. *Biotechnologia Acta*, 2020. **13**(2):32-37.
7. Horak I.R., Latyshko N.V., Hudkova O.O., Kishko T.O., Khudiakova O.V., Gerashchenko D.S., Skaterna T.D., Krysiuk I.P., S. G. Shandrenko, Drobot L.B.. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects redox balance in breast cancer cells. 2020. *Ukr. Biochem. J.* **92**(4):24-34.

Патенти

8. Патент на корисну модель 93589 UA, МПК C07C 45/75 (2006.01). Спосіб кількісного визначення формальдегіду в організмі тварин при умовах, наближених до *in vivo*. / Шандренко С.Г., Крисюк І.П., Токарчук К.О., Савчук М.М. Опубл. 10.10.2014, Бюл. №19.

9. Патент на корисну модель 125508 UA, МПК C07D 401/02 (2006.01). Комплексна дієтична добавка при гіперкарбонільному стані. Шандренко С.Г., Крисюк І.П., Володіна Т.Т. Опубл. 10.05.2018, Бюл. №9.

10. Патент на корисну модель 129572 UA, МПК (2018.01) A61K 31/00. Добавка дієтична для застосування при онкологічних захворюваннях. Шандренко С.Г., Крисюк І.П. Опубл. 12.11.2018, Бюл. №21.

Апробація матеріалів дисертації:

11. Шандренко С.Г., Володіна Т.Т., Дзвонкевич Н.Д., Петрунь Л.М., Крисюк І.П., Попова Н.М., Дмитренко М.П. Зміни активності лізилоксидази та вмісту формальдегіду у разі семікарбазид-індукованого латиризму. / Мат. X Українського біохімічного з'їзду 13-17 вересня 2010 р. Одеса. 2010. **82**(4;2) С. 194.

12. Крисюк І.П., Кнауб А.Я. Порівняльне дослідження глікування L – лізину *in vitro* деякими альдегідами ендogenous походження. / Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 5-8 квітня. Львів. 2011. С. 215.

13. Крисюк І.П., Кнауб А.Я., Дмитренко Н. П. О возможностях использования флуорескамина при изучения взаимодействия некоторых альдегидов ендogenous происхождения с L – лизином в опытах *in vitro*. / Матеріали V Всеукраїнської конференції «Хімічні проблеми сьогодення», 14-17 березня. Донецьк. 2011. С. 56-57.

14. Крисюк І.П., Кнауб А.Я., Шандренко С.Г. Порівняльне дослідження модифікації альбуміну деякими альдегідами *in vitro*. / Мат. VIII Міжнародної науково-технічної конференції. “Актуальні питання біологічної фізики та хімії” 23-27 квітня. Севастополь. 2012. С.239.

15. Дзвонкевич Н.Д., Крисюк І.П., Володіна Т.Т., Попова Н. М., Шандренко С.Г. Порівняльні дослідження дії ряду альдегідів на препарати колагену *in vitro*. БФФХ-2012. / Матеріали VIII Міжнародної науково-технічної конференції. Севастополь. 2012. С. 251-252.

16. Tokarchuk K.O., Zaitseva O.V., Krysyuk I.P., Shandrenko S.G. Participation of aldehydes in oxidative stress parameters development under rhabdomyolysis and streptozotocin-induced diabetes rat's models. / VIII Всеукраїнська научна конференція студентів, аспірантів и молодих учених с міжнародним участієм "Хімічні проблеми сучасності", Донецьк. 2014. С. 160.

17. Tokarchuk KO, Zaitseva OV, Krysiuk IP, Shandrenko SG. The peculiarities of carbonyl stress development in rats under conditions of diabetes and diabetes, complicated with rhabdomyolysis. Матеріали XII Українського біохімічного Конгресу м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. *Медицина та клінічна хімія*. 2019. **21**(3) (додаток), 142.

18. Horak I, Gudkova O, LatyshkoN, Kishko T, Khudiakova O, Volodina T, Popova N, Skaterna T, Krysiuk I, Shandrenko S, Drobot L. Ruk/CIN85-overexpressing murine breast adenocarcinoma 4T1 cells possess properties of amoeboid mode of migration/invasion. Матеріали XII Українського біохімічного Конгресу м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. *Медицина та клінічна хімія*. 2019. **21**(3) (додаток), 77.

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень	22
Вступ	24
РОЗДІЛ I	
Огляд літератури	30
1.1 Метаболізм альдегідів та їх біологічна роль в організмі	30
1.2 Альдегід-опосередковані постсинтетичні модифікації протеїнів	38
1.3 Гальмування процесів модифікування протеїнів, опосередкованих альдегідами	43
1.4 Клінічне значення показників альдегід-залежної модифікації протеїнів	51
РОЗДІЛ II	
Матеріали та методи досліджень	60
2.1 Модифікування лізину, альбуміну та желатини альдегідами в досліджах <i>in vitro</i>	60
2.1.1. Модифікування лізину	60
2.1.2. Модифікування альбуміну сироватки людини	60
2.1.3. Модифікування пептидів колагенової природи	60
2.2 Умови проведення дослідів <i>in vivo</i> на щурах	61
2.2.1. Модель гіперкарбонільного стану – гліцерол-стимульований рабдоміоліз	61
2.2.2. Модель гіперкарбонільного стану – стрептозотоцин-індукований цукровий діабет	62
2.2.3. Модель гіпокарбонільного стану – семікарбазид-стимульований латиризм	63
2.2.4. Модель карциноми легені Льюїс	63
2.3 Приготування та дослідження ефективності препарату «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» для зменшення наслідків карбонільного стресу	64
2.4 Аналітичні методи	64
2.5 Імуноензимний аналіз карбонільних груп в протеїнах	68
2.6 Отримання спектрів електронного парамагнітного	69

резонансу

2.7 Імуноензимний аналіз маркера постсинтетичних модифікацій протеїнів – карбоксиметиллізину	71
2.8 Електрофоретичне дослідження модифікації структури протеїнів	72
2.9 Флуоресцентна спектроскопія	72
2.10 Рентгенологічне дослідження тварин	73
2.11 Полімеразна ланцюгова реакція	73
2.12 Статистична обробка результатів	75
РОЗДІЛ III	
Результати та їх обговорення	76
3.1 Дія екзогенних альдегідів та їх комплексів на модифікацію лізину, альбуміну сироватки крові людини та пептидів колагенової природи в дослідах <i>in vitro</i>	76
3.1.1 Порівняльна характеристика альдегідів за здатністю модифікувати лізин	76
3.1.2 Порівняльна характеристика альдегідів за здатністю модифікувати залишки лізину у складі альбуміну сироватки людини	78
3.1.3 Модифікація пептидів колагенової природи екзогенними альдегідами	85
3.2 Розробка «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» для зменшення інтенсивності карбонільного стресу, та дослідження ефективності її застосування за умов <i>in vitro</i>	87
3.2.1 Приготування «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» та тестування ефективності її дії	87
3.3 Гліцерол-стимульований рабдоміоліз - модель гіперкарбонільного стану	88
3.3.1 Біохімічна характеристика розвитку рабдоміолізу	88
3.3.2 Ефективність застосування N-АЦ для зменшення інтенсивності карбонільного стресу на моделі рабдоміолізу	90
3.4 Стрептозотоциновий діабет - модель гіперкарбонільного	92

стану	
3.4.1. Біохімічна характеристика розвитку цукрового діабету	92
3.4.2. Ефективність «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» щодо зменшення інтенсивності карбонільного стресу на моделі СТЦД	94
3.5 Семікарбазид-стимульований латиризм - модель гіпокарбонільного стану	95
3.5.1 Зміни морфометричних показників за умов розвитку латиризму	95
3.5.2 Структурні зміни у будові скелету щурів за латиризму	96
3.5.3 Зміни біохімічних показників за латиризму	97
3.6 Карцинома легені Льюїс - модель гіперкарбонільного стану	99
3.6.1. Біохімічна характеристика розвитку карциноми легені Льюїс	99
3.6.2. Ефективність «Добавки дієтичної для застосування при онкологічних захворюваннях» для зменшення інтенсивності карбонільного стану на моделі перевивної карциноми Льюїс	104
Узагальнення результатів	106
ВИСНОВКИ	112
Список використаних джерел	114
Додаток 1	
Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації	133

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДГ1 – альдегіддегідрогеназа
АДГ3 – глутатіонзалежна формальдегіддегідрогеназа
АКР - акролеїн
АФН - активні форми нітрогену
АФО – активні форми кисигену
ГЛ – гліоксаль
ГОЛД - гліоксаль-лізін-димер
ДАО – діамінооксидаза
3-ДГ – 3-дезоксиглюкозон
ДРБ – дезоксирибоза
2,4-ДНФГ - 2,4-динітрофенілгідрозин
ЕДТА - етилендіамінтетраацетат
ЕПР – електронний парамагнітний резонанс
ЖЛ - желатина
і-NO-сінтаза – індукцібельна NO-сінтаза
ІФЛ – інтенсивність флуоресценції
КАТ-кат – каталазна активність каталази
КАТ-перокс – пероксидазна активність каталази
КЕЛ - N-ε-карбоксіетиллізін
КЛЛ – карцинома легені Льюїс
КМЛ – N-ε-карбоксіметиллізін
КПГ – кінцеві продукти неензиматичного глікування
КПЛ – кінцеві продукти перикисного окиснення ліпідів
ЛО – лізилоксидаза
ЛСА - альбумін сироватки людини
МГЛ - метилгліоксаль
МДА – малоновий діальдегід
МОЛД - метилгліоксальлізіндимер
НАД(Н) – нікотинамідаденіндинукліотид (відновлений)
НВЧ - надвисокочастотне випромінювання
ПААГ- паліакриламідний гель
ПАО - поліамінооксидаза

ПКМ - позаклітинний матрикс
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
РБ – рибоза
РКС – реактивні карбонільні сполуки
РМ - рабдоміоліз
САО – семікарбазидчутлива амінооксидаза
СОД – супероксиддисмутаза
СТЦД – стрептозотоцин-індукований цукровий діабет
ТБК – тіобарбітурова кислота
ТІФА - твердофазний імуноензимний аналіз
ТХО - трихлороцтова кислота
ТФБ - К-фосфатний буфер + Tween-20
ЦитР450 – цитохром Р-450
ФА - формальдегід
ФЛА – флуоресцентні аддукти
3-AP - 3-амінопропаналь
GSH – глутатіон відновлений
GSSG – глутатіон окислений
LOXL (1-3) – ЛО-подібні ензими
MAPK – протеїнкіназа, що активується мітогенами
N-АЦ – N-ацетилцистеїн
Nrf2 – транскрипційний фактор
NF-κB - транскрипційний фактор
p38 – кіназа p38, що активується мітогенами
SDS – додецилсульфат Na

ВСТУП

Актуальність теми. За сучасними уявленнями, альдегіди, що утворюються у процесі метаболізму, залежно від їх концентрації можуть відігравати регуляторну роль або виявляти токсичні властивості [1, 2]. Формування постсинтетичних модифікацій протеїнів може відбуватись в організмі як ензиматичним шляхом, так і внаслідок неензиматичного глікування, а також при безпосередній взаємодії з численними альдегідами різного походження [3]. За фізіологічних умов глікування протеїнів відбувається в організмі постійно з невеликою швидкістю, але за патологічних станів цей процес інтенсифікується та супроводжується утворенням низки реакційноздатних альдегідів [4]. Перш за все, до них відносять моносахариди, наприклад, глюкоза, фруктоза, рибоза, гліцеральдегід-3-фосфат, що є альдозами (полігідроксиальдегіди) і кетозами (поліоксикетони) та мають редукувальні властивості. Завдяки цим властивостям вони здатні неензиматично реагувати з SH- та NH₂-групами нуклеїнових кислот, ліпідів та протеїнів [5]. Цим запускається низка так званих реакцій Майяра або глікування. Ендогенні альдегіди мають різні протеїномодифікувальні властивості. Вони можуть конкурувати між собою за вплив на ензими, рецептори, структурні протеїни, нуклеїнові кислоти та інші об'єкти-мішені, демонструючи підсилення або зменшення ефекту їх комбінованої дії [6]. Гіперпродукування реакційноздатних альдегідів суттєво посилюється при гіперглікемії, гострих і хронічних запальних процесах та старінні. Це призводить до інтенсифікації постсинтетичних модифікацій протеїнів, що спричиняють різноманітні порушення біологічних структур, модулювання активності ензимів та утворення невластивих для організму протеїнів, які, в свою чергу, можуть бути причиною та наслідком багатьох захворювань [7, 8]. Наприклад, в патогенезі цукрового діабету привертає увагу участь альдегідів, як реакційноздатних карбонільних сполук, в утворенні кінцевих продуктів перекисного окиснення ліпідів та глікування

протеїнів [9, 10, 11, 12, 13], що призводить до пошкодження β -клітин підшлункової залози. Інша патологія, яку пов'язують з оксидативним стресом, рабдоміоліз, за якого відбувається пошкодження скелетної мускулатури з вивільненням внутрішньоклітинного вмісту міоцитів у кровообіг, що спричиняє, в тому числі, мітохондрійну дисфункцію, пероксидацію нуклеїнових кислот, ліпідів і протеїнів [14, 15]. Рабдоміоліз є поширеним синдромом, причинами якого можуть бути травми, інфекції, температурні крайності, наркотики, токсини, електролітні та ендокринні порушення, а також вроджені міопатії та дисфункція сполучної тканини. До патологічних станів, потенційно пов'язаних зі зниженням вмісту альдегідів в організмі, відносять латиризм. Зазначене захворювання є формою незворотного спастичного парапарезису, що не прогресує, пов'язаною з недостатньо зрозумілими дегенеративними змінами спинного мозку. Встановлено, що до розвитку латиризму призводить тривале надмірне споживання (монодієта) горішки сійного *Lathyrus sativus* з високим вмістом токсичної сполуки β -амінопропіонітрилу. Підтвердженими є дані, згідно яких β -амінопропіонітрил блокує перетворення альдегідних груп, необхідних для посттрансляційного зшивання колагенових структур [16]. Повідомлялося про експериментальні тваринні моделі латиризму, але жодна з них не була достатньо досліджена, і збіг між цими експериментальними захворюваннями та станом людини є недоведеним [17]. Нові дослідження [18] з MRC Cancer Unit показали, що альдегіди можуть сприяти розвитку онкологічного процесу, руйнуючи захисні механізми, які запобігають мутаціям у генах людини. Згідно даних Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ) 70% летальних випадків припадає на ускладнення, які є наслідком хронічних захворювань, таких як діабет, атеросклероз, остеоартрози, нефропатії, септичні стани, колагенози, гепатити, катаракта, онкозахворювання, кардіоваскулярні, легеневі, нейродегенеративні хвороби (Альцгеймера, Паркінсона тощо), в розвитку яких реакційноздатні альдегіди відіграють

важливу роль, але 80% цих смертей є передчасними і їм можна було б запобігти. Тому подальше вивчення механізмів та пошук нових засобів для зменшення патологічних наслідків гіперпродукування альдегідів є актуальною задачею сучасної біохімії.

Зв'язок роботи з науковою тематикою організації. Робота виконана у відповідності з напрямом науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України в рамках бюджетних тем відділу регуляції обміну речовин та відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України: «Дослідження ролі взаємозв'язку між метаболізмом формальдегіду і оксиду азоту в механізмі їх токсичної дії» (№ держреєстрації 0108U0001122, 2008-2009 рр.); «Структурні зміни колагену позаклітинного матриксу як чинник регуляції функціонування стромально-гемопоетичного комплексу і процесів мінералізації кісткової тканини» (№ держреєстрації 0107V007187, 2007-2011 рр.); «Порівняльне дослідження біологічної дії ендогенних альдегідів як регуляторів метаболізму та чинників його порушень при патологічних станах різного генезу» (№ держреєстрації 0110U002700, 2010-2014 рр.); «Роль амінооксидаз у розвитку карбонільно-оксидативного стресу за патологій різного генезу» (№ держреєстрації 0115U003644, 2015-2017 рр.), «Вивчення особливостей зміни стану позаклітинного матриксу як показника розвитку онкологічного процесу та розробка шляхів його корекції» (№ держреєстрації 0117U004344, 2017-2021 рр.).

Мета та завдання дослідження

Мета роботи: З'ясувати особливості утворення аддуктів альдегідів з протеїнами в дослідах *in vitro* та розвитку гіпер/гіпокарбонільного стану в організмі тварин, а також розробити засоби корекції цих станів.

Відповідно до цієї мети були поставлені наступні **завдання**:

1. В дослідах *in vitro* порівняти аддуктоутворювальні властивості низки альдегідів за їх дії на препарати лізину, альбуміну та пептиди колагенової природи.

2. На моделі гліцерол-стимульованого рабдоміолізу з'ясувати особливості протікання гіперкарбонільного стану та можливість його корекції.

3. На моделі стрептозотоцин-індукованого діабету дослідити можливість корекції гіперкарбонільного стану розробленою комплексною дієтичною добавкою.

4. На моделі латиризму, індукованого субхронічним введенням хелатора альдегідів та інгібітора альдегідоутворювальних ензимів, семікарбазиду, вивчити особливості протікання гіпокарбонільного стану.

5. На моделі карциноми легені Льюїс у мишей дослідити можливість модулювання активності альдегідоутворювальних ензимів препаратом, розробленим на основі модифікованого креатину.

Об'єкти дослідження. Порушення метаболізму альдегідів за умов розвитку патологічних станів різного генезу на тваринних моделях *in vivo* та розробка можливих підходів їх корекції.

Предмет дослідження. Встановлення закономірностей змін рівня модифікацій протеїнів в експериментах *in vitro* та метаболічних змін за умов гіпо- та гіперпродукування альдегідів на моделях *in vivo* та можливі варіанти їх корекції

Методи дослідження: методи експериментальної біохімії, електронного парамагнітного резонансу, імуноензимного аналізу, спектрофотометричні, флуоресцентні, електрофоретичні, ПЛР-аналізу, рентгенологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Комплексне застосування різних експериментальних підходів та моделей *in vitro* й *in vivo* дало можливість отримати нові знання та поглибити розуміння особливостей перебігу альдегід-індукованих трансформацій. Вперше проведено комплексне дослідження наслідків зміни концентрації альдегідів за низки патологічних станів на біохімічні процеси, асоційовані з метаболізмом

біогенних амінів, та системи захисту організму тварин від оксидативно/карбонільного стресу. Встановлено, що альдегіди є важливим біохімічним чинником розвитку патологій, які супроводжуються карбонільним стресом, як за зменшення (латиризм), так і за збільшення (діабет, рабдоміоліз, карцинома легені Льюїс) їх концентрації. На тваринних моделях експериментально обґрунтовано ефективність застосування розроблених нами комплексних дієтичних добавок, скерованих на зменшення наслідків карбонільного та оксидативного стресу. Результати проведених досліджень дозволяють розширити існуючі уявлення про роль ендогенних альдегідів у модулюванні мережі регуляторних механізмів, причетних до розвитку оксидативно-карбонільного стресу за вказаних патологічних станів.

Практична значимість одержаних результатів. На основі проведеного аналізу закономірностей змін рівня модифікацій протеїнів за умов гіперпродукування та гіпопродукування альдегідів на моделях *in vivo* та в дослідях *in vitro* розроблено методи зниження токсичного впливу альдегідів за умов їх гіперпродукування в організмі піддослідних тварин на моделях рабдоміолізу і діабету препаратом «Комплексна дієтична добавка при гіперкарбонільному стані» (КДБГС), та на моделі карциноми легені Льюїс «Добавка дієтична для застосування при онкологічних захворюваннях» (ДДЗОЗ). Отримано позитивні результати щодо покращення перебігу змодельованих патологічних процесів та відповідні патенти на корисні моделі. Результати дисертаційної роботи рекомендуються для використання в загальних курсах «Біохімія» та «Біотехнологія» для студентів університетів та аспірантів з відповідних спеціальностей.

Особистий внесок здобувача. Автором особисто здійснено пошук та проведено аналіз наукової літератури за темою дисертації, розроблена схема та обґрунтована методологія постановки експериментів разом з науковим керівником проф. Дробот Л.Б. та провідним науковим співробітником

Шандренком С.Г., визначені завдання щодо дослідження впливу альдегідів на зміну рівнів і особливостей модифікацій протеїнів за умов *in vitro* та на тваринних моделях гіперпродукування та гіпопродукування альдегідів *in vivo*. Експериментальна частина дисертаційної роботи виконана здобувачем особисто, за винятком деяких експериментів, що проводились спільно зі співробітниками відділу регуляції обміну речовин і які є співавторами відповідних публікацій, проведений аналіз отриманих результатів, обґрунтовано основні положення та сформульовано висновки роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи представлено на українських та міжнародних конференціях та з'їздах, а саме: X Українському біохімічному з'їзді (Одеса, 2010), VII Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2011), V Всеукраїнській конференції «Хімічні проблеми сьогодення», (Донецьк, 2011), VIII Міжнародній науково-технічній конференції (Севастополь, 2012), VIII Всеукраїнській конференції «Хімічні проблеми сьогодення», (Донецьк, 2014); XII Українському біохімічному конгресі (Тернопіль, 2019).

Публікації. Результати досліджень представлені у 15 роботах, з них 7 статей, опублікованих у фахових закордонних та вітчизняних наукових виданнях, що включені в перелік, затверджений ДАК України, та 8 тезах доповідей у матеріалах вітчизняних та міжнародних з'їздів та конференцій. За матеріалами дисертації отримано 3 патенти на корисну модель.

РОЗДІЛ I

Огляд літератури

1.1 Метаболізм альдегідів та їх біологічна роль в організмі

Альдегіди або реактивні карбонільні сполуки (РКС), що утворюються в організмі в процесі метаболізму, відіграють специфічні ролі у контролі регуляторних мереж клітин та різняться за своєю фізіологічною дією та токсичністю [19]. Ендогенні альдегіди утворюються в організмі як проміжні продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), [20], що призводить до посилення неензиматичного глікування протеїнів [21], та одновуглецевого обміну амінокислот. Останній довгий час вважався рутинним процесом. Водночас, сучасні дані літератури свідчать про те, що гіперактивування цього шляху є можливим рушієм онкогенезу та впливає на клітинний епігенетичний статус [22]. Альдегіди, завдяки високій реакційній здатності можуть конкурувати між собою за вплив на ензими та структурні протеїни, демонструючи підсилення або зменшення ефекту їх комбінованої дії. Ці сполуки, як досить сильні електрофіли, в реакції з тільними та аміногрупами протеїнів формують токсичні аддукти [23]. Представники α,β -ненасичених альдегідів зазвичай асоціюються з гепатотоксичною реакцією, що значно збільшує їх потенціал до виснаження клітинного пулу глутатіону (GSH) та утворення ковалентних аддуктів з протеїнами [24]. Існує декілька шляхів перетворення альдегідів в процесі метаболізму. За активації перекисного окиснення ліпідів та/або гіперглікемії утворюються різні альдегіди, які, залежно від концентрації, можуть відігравати регуляторну роль або проявляти токсичні властивості. Перш за все, до них відносять моносахариди, наприклад, глюкоза, фруктоза, рибоза, гліцеральдегід-3-фосфат, що є альдозами (полігідроксиальдегіди) і кетозами (поліоксикетони) та мають редукувальні властивості. За патологічних умов активується поліольний шлях перетворення глюкози. Також альдегіди утворюються

ендогенно за участі амінооксидаз (в тому числі поліамінооксидаз), цитохрому P-450 (ЦитP-450) та в мієлопероксидазній реакції [25].

Альдегіди, які можуть мати пошкоджуючий вплив на біологічні молекули, відрізняються за кількісним карбонільним складом та належать до декількох основних груп (Рис. 1.1): α,β -ненасичені альдегіди, діальдегіди та кето-альдегіди [26]. В наших дослідженнях були використані: α,β -ненасичений альдегід акролеїн (АКР) [27], α - і β -дикарбоніли: малоновий діальдегід (МДА), гліоксаль (ГЛ) [28], метилгліоксаль (МГЛ) [29], а також формальдегід (ФА). ФА, проміжний продукт одноуглецевого обміну амінокислот, у дозах вищих за 0,1 мМ крові у щурів, мавп та людей є цитотоксичним. Окиснення форміату каталізує глутатіон-залежна та глутатіон-незалежна дегідрогенази в назальних тканинах і є головним шляхом детоксикації даної сполуки [30]. За даними літератури, в зв'язку з особливостями будови, насичені альдегіди є менш реакційно здатними ніж ненасичені карбонільні сполуки [24]. За розвитку оксидативного стресу, тобто за умов надмірних рівнів активних форм оксисену (АФО), відбувається посилення процесів ПОЛ з подальшим утворенням альдегідів, ненасичених (4-гідроксиноненаль [31]) та дикарбонілів (ГЛ, МГЛ [32], МДА [33]). Відомо, що як МДА, так і 4-гідроксиноненаль здатні зв'язуватися з протеїнами і утворювати стійкі аддукти, які вважаються кінцевими продуктами перекисного окиснення ліпідів (КПЛ). Продукти глікування протеїнів, які називаються кінцевими продуктами глікування (КПГ), зазвичай накопичуються при старінні та пов'язаних з окиснювальним стресом захворюваннях, таких як атеросклероз, діабет та нейродегенеративні хвороби. Етаналь, пропаналь, гексаналь, гліоксаль, метилгліоксаль, 4-гідрокси-2-гексаналь, акролеїн, формальдегід та ацетальдегід також утворюють КПГ. Підвищені рівні реакційних карбонільних сполук (РКС) формують в організмі карбонільний стрес, що характеризується утворенням їх аддуктів з протеїнами, та призводять до порушення функціонування

Автоокислення глюкози призводить до генерування реакційноздатних ненасичених альдегідів, до яких належать ГЛ та МГЛ, що за умов гіперглікемії є причиною розвитку метаболічних порушень. За даної патології, спостерігається, в першу чергу, дисбаланс обміну вуглеводів та процесів карбонілювання, формуються реакційноздатні КПП, в каскаді утворення яких ініціюється повторне утворення АФО та РКС [36].

Мікрovasкулярні пошкодження пов'язують з накопиченням КПП в стінках судин, що призводить до порушення функціонування тканин та органів. КПП можуть змінювати структуру позаклітинного матриксу; модифікувати дію гормонів, цитокінів та вільних радикалів за рахунок залучення рецепторів клітинної поверхні, впливаючи таким чином на функціонування внутрішньоклітинних протеїнів [37].

Раніше повідомлялося, що очищені з декількох різних біологічних об'єктів препарати формальдегіддегідрогенази каталізували НАД-залежне окиснювальне ацилювання глутатіону метилгліоксалем з утворенням S-пірувілглутатіону. Це дозволило припустити участь даного ензиму в метаболізмі метилгліоксалю. Однак, згодом було виявлено, що формальдегіддегідрогеназа не використовує вищезгаданий альдегід або споріднені α -кетоальдегіди як субстрати, оскільки їх використання ензимом за умов, що сприяють прямій реакції, не призводило до утворення S-пірувілглутатіону. Водночас, застосування синтетичного S-пірувілглутатіону за умов, що сприяють зворотній ензиматичній реакції, не призводило до генерування метилгліоксалю. Крім того, частково очищена з печінки людини формальдегіддегідрогеназа, всупереч попередньо отриманим даним, не виявляла субстратної специфічності до метилгліоксалю та кількох споріднених альфа-кетоальдегідів. Такі суперечливі попередні дані можуть бути зумовлені підтвердженою присутністю домішків формальдегіду в деяких комерційно доступних препаратах метилгліоксалю. У відповідному дослідженні шляхом збалансованого додавання формальдегіду до глутатіону

було показано утворення та катаболізм S-гідроксиметилглутатіону за збільшенням приблизно в 20 разів константи швидкості першого порядку реакції розкладання даної сполуки на глутатіон та формальдегід ($k=5,03\pm 0,30$ хв⁻¹, рН 8,0, 25°C) [38].

Наразі, як шлях знешкодження метилгліоксалу, підтверджено гліоксалазний шлях, процес з двох послідовних реакцій, що каталізуються тіолозалежними ензимами, гліоксалазами I та II. Перша з них каталізує ізомеризацію спонтанно утвореного гемітіоацетального аддукту між глутатіоном та метилгліоксалем, S-2-гідроксиацилглутатіону, у (S)-D-лактоїлглутатіон. Друга, гліоксалаза II, гідролізує (S)-D-лактоїлглутатіон до D-лактату та GSH. На основі розрахованої константи швидкості та рівноваги гідратації метилгліоксалу запропоновано кількісну кінетичну модель глутатіон-залежної конверсії цього альдегіду до D-лактату в еритроцитах ссавців. Модель виявляє такі властивості за умов, коли концентрація субстрату є невеликою порівняно зі значеннями K_m для гліоксалаз. Загальна швидкість конверсії МГЛ в D-лактат в першу чергу обмежена швидкістю утворення діастереотопічних тіогеміацеталів. Гідратація МГЛ є кінетично несуттєвою, оскільки константа швидкості цієї реакції, що спостерігається, в рази менша, ніж відповідний показник формування тіогеміацеталів. Швидкість конверсії МГЛ до (S)-D-лактоїлглутатіону є майже оптимальною, виходячи з того, що константа швидкості реакції гліоксалази I, що спостерігається, ($k_{cat}= 4-20$ с⁻¹ для свиней, щурів та еритроцитів людини) приблизно дорівнює константі швидкості розкладання тіогеміацеталів, що спостерігається, з утворенням глутатіону та МГЛ ($k_{obs}= 11$ с⁻¹, рН 7). Здатність гліоксалази I використовувати діастереотопічні тіогеміацетали, як субстрати, має 3-6-кратну перевагу в стаціонарній швидкості конверсії діастереомерів у (S)-D-лактоїлглутатіон [39].

Припускають, що генерування альдегідів, як токсичних похідних перекисного окиснення ліпідів може бути однією з найважливіших

біохімічних причин атерогенезу, оскільки протеїно-альдегідні аддукти присутні в артеріальних бляшках людей і тварин, а атеросклероз пов'язаний з утворенням автоантитіл до цих аддуктів [40, 41].

Утворення альдегідів відбувається також внаслідок перетворення поліамінів (путресцин, спермідин, спермін), що присутні у всіх клітинах і беруть участь у клітинному рості, диференціюванні та канцерогенезі. Катаболізм поліамінів відбувається за участі діамінооксидази (ДАО, деградація путресцину) та поліамінооксидази (ПАО, утилізація спермідину, сперміну та їх ацетильованих похідних) з утворенням H_2O_2 , який детоксикується пероксисомальною каталазою, NH_3 та відповідного до субстрату аміноальдегіду. 3-амінопропаналь, продукт катаболізму сперміну та спермідину, є потужним лізосомотропним нейротоксином за умов церебральної ішемії. 3-амінопропаналь та спонтанно утворений з нього акролеїн вважають основними цитотоксичними продуктами за травми мозку [42]. Саме утворення акролеїну зумовлює цитотоксичний ефект сперміну для пухлинних клітин. ДАО, головним чином, міститься в слизовій оболонці кишечника та нирці, а також індукується путресцином або пошкодженнями тканин серця, печінки та мозку.

Ще одна амінооксидаза, що утилізує первинні аміни, семікарбазидчутлива амінооксидаза (САО) існує у вигляді мембранних форм у судинній системі, зокрема, клітинах гладенької мускулатури серцевих судин, клітинах нирки, хрящів і адипоцитах або в розчинній формі у сироватці. Ці ензими містять іони міді (II) та топахінон як кофактори. САО сироватки крові підвищується у пацієнтів з діабетичними ускладненнями, судинними розладами та серцевими захворюваннями. Ці ензими виявляють певну субстратну специфічність до сперміну та спермідину, але переважно каталізують окисне дезамінування метиламіну, аміноацетону та промислового хімікату алліламіну в плазмі з утворенням аміноальдегідів, формальдегіду, метилглюксалю та високотоксичного акролеїну, відповідно.

Аміноальдегідні та диальдегідні продукти можуть потім детоксифікуватися альдегіддегідрогеназою або піддаватися спонтанному перетворенню на акролеїн. Останнє, швидше за все, відбувається у позаклітинному просторі, оскільки і САО, і поліаміни містяться в плазмі, на відміну від альдегіддегідрогенази. Клітини, які швидко діляться, такі як пухлинні, кісткового мозку та епітелію кишечника, мають підвищений рівень поліамінів завдяки їх посиленому синтезу орнітиндекарбоксилазою/S-аденозилметіоніндекарбоксилазою та збільшенню поглинання поліамінів, що опосередковується транспортером та інгібується самими поліамінами за принципом зворотного зв'язку. Крім того, аналоги поліамінів зараз розробляються як протипухлинні засоби, оскільки вони зазнають нерегульованого швидкого масового внутрішньоклітинного та внутрішньомітохондрійного нагромадження, що призводить до апоптозу пухлинних клітин та інгібування амінооксидаз [43].

Формальдегід та метилгліоксаль, як вже зазначалось, утворюються за участі САО з метиламіну, метаболіту епінефрину та саркозину, та аміноацетону, продукту декарбоксилювання 2-аміно-3-кетобутирату, утвореного в процесі мітохондрійного метаболізму треоніну. Утворення акролеїну через САО в коронарній артерії викликає її скорочення, що призводить до некрозу міокарду. Відомо, що в плазмі крові діабетиків при неконтрольованій гіперглікемії спостерігаються високі рівні активності САО та, відповідно, метилгліоксалу, що викликає зшивання протеїнів судинного ендотелію, тобто, пошкодження цих клітин та розвиток діабетичного атеросклерозу [25].

Нейтралізація карбонільних метаболітів розглядається як механізм захисту клітин від змін за різних патологічних умов, що супроводжуються окиснювальним стресом. Вільнорадикальні карбонільні аддукти окиснення виступають маркерами пошкодження клітин. Завдяки своїй високій

реакційній здатності ці аддукти демонструють найбільш виражені цитотоксичні та генотоксичні властивості [44].

Катаболізм ендогенних альдегідів відбувається за посередництва альдегіддегідрогеназної системи, функцією якої є окиснення альдегідів до карбонових кислот, та альдегідредуктазного шляху, в якому відбувається відновлення ендогенних альдегідів до спиртів. Нагромадження альдегідних аддуктів окиснювального пошкодження ліпідів та протеїнів на тлі зниження активності ензимів, що забезпечують катаболізм альдегідів, може розглядатися як можливий механізм дисфункції гепатоцитів за умов токсичного пошкодження [45].

Надродина альдо-кето-редуктаз (АКР) включає декілька ензимів, які каталізують окиснювально-відновлювальні трансформації альдегідів та кетонів до спиртів в процесах біосинтезу та детоксифікування, а також в проміжному метаболізмі. Субстратами для даної родини ензимів є глюкоза, кінцеві продукти глікування, продукти перекисного окиснення ліпідів та ксенобіотики. АКР людини відрізняється від родини цих ензимів у гризунів за структурною будовою. Так, один з членів даної родини, АКР1В1, в катаболізмі глюкози має подвійну роль. З одного боку, він виступає як детоксикувальний ензим та бере участь у виведенні токсичних продуктів перекисного окиснення ліпідів, а, з іншого, за гіперглікемії шляхом перетворення надлишку глюкози в сорбіт та наступним його накопиченням в клітинах, зокрема в катарактній лінзі, призводить до катарактогенезу та нейропатії. Крім того, нещодавно було продемонстровано, що АКР1В1 опосередковує дію факторів росту та міогенів. Завдяки широкій субстратній специфічності, АКР відіграють важливу роль у II фазі детоксифікування великої кількості фармацевтичних препаратів, ендотоксинів та ксенобіотиків [46].

Таким чином, карбонільний стрес, є однією з ознак і/або причиною широкого спектру патологічних станів організму.

1.2 Альдегід-опосередковані постсинтетичні модифікації протеїнів

В організмі в процесі активації перекисного окислення ліпідів та/або гіперглікемії утворюються різні альдегіди, які залежно від концентрації можуть відігравати регуляторну роль [47], або виявляти токсичні властивості [48]. Перш за все, до них відносять моносахариди (глюкоза, фруктоза, рибоза, гліцеральдегід-3-фосфат), що є альдозами (полігідроксиальдегіди) і кетозами (поліоксикетони), α -оксоальдегіди (гліоксаль, метилгліоксаль, 3-дезоксиглюкозон) та ін. [49] та мають редукувальні властивості. Завдяки цьому вони здатні неензиматично реагувати з SH- та NH₂-групами протеїнів, ліпідів і нуклеїнових кислот [50]. Цим запускається низка так званих реакцій Майяра або глікування [51]. Так, альдоза утворює з вільними аміногрупами протеїнів (зокрема ϵ -NH₂-групами лізину та аргініну) нестійкі Шиффові основи, які протягом часу зазнають відповідну рекомбінацію в набагато більш стабільні кетоаміни (так звані продукти Амадори, прикладом яких є карбоксиметил-, карбоксиетиллізин та карбоксиметил-, карбоксиетилцистеїн) [52]. Згодом, в результаті реакцій дегідратації та конденсації, в протеїнах утворюються відповідні аддукти, дикарбонільні інтермедіати, а також внутрішньо- і міжмолекулярні зшивки [53,54]. До необоротних стабільних кон'югатів, що утворюються при цьому (пентозидин та імідазольні похідні), відносять КПП (Рис. 1.2) [55].

КПП можуть бути визначені, як клас гетерогенних сполук моносахаридів з протеїнами з характерною жовто-коричневою флуоресценцією, що утворилися внаслідок реакцій дегідратації, конденсації, фрагментації, оксидації та циклізації [56]. Їх формування під впливом редукувальних цукрів відбувається дуже повільно, і тому вони накопичуються в процесі старіння, головним чином, в протеїнах позаклітинного матриксу (колагені та еластині), що мають тривалий термін життя і є біомаркерами хронічних захворювань та старіння [57].

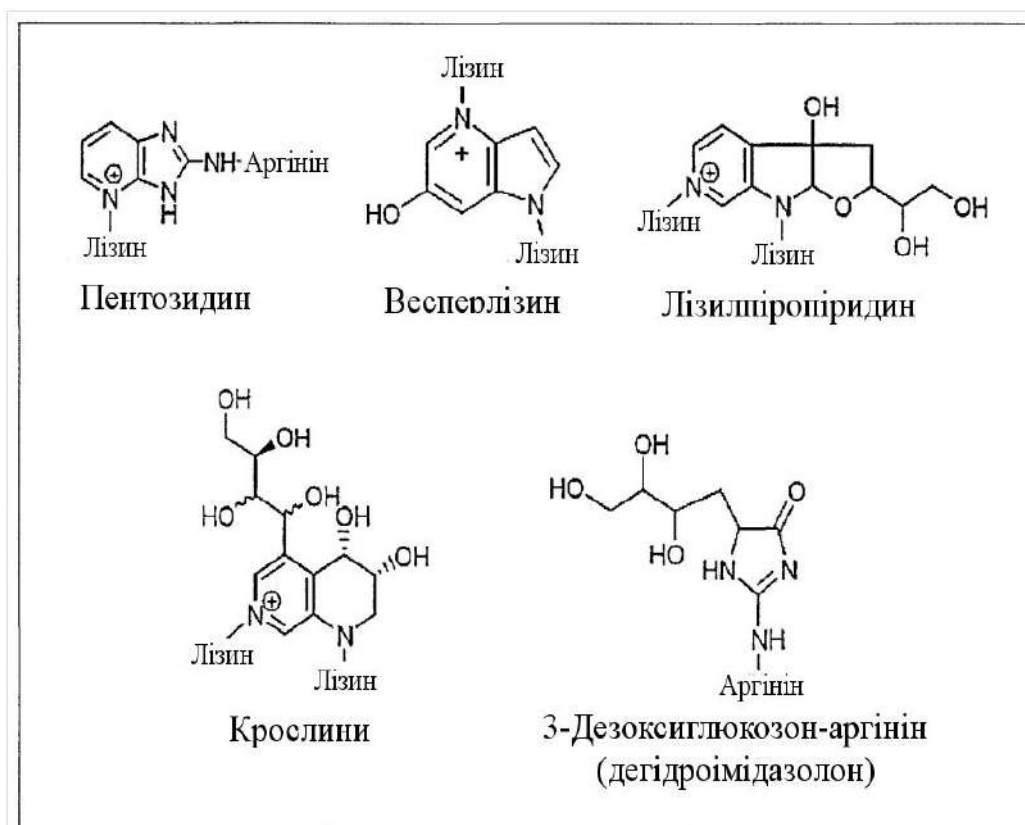


Рис. 1.2. Кінцеві продукти глікування, які мають флуоресцентні властивості.

Утворення КПП значно посилюється за діабету та метаболічних розладах обміну, що супроводжуються діабетичною глюкозурією та гіперпродукування редукувальних моносахаридів. Цьому сприяє автоокислення редукувальних моносахаридів, внаслідок чого утворюються АФО (пероксид водню та вільнорадикальні інтермедіати), а також реактивні α -оксоальдегіди, формальдегід, ацетальдегід. Утворення КПП відбувається в організмі не тільки через моносахаридний шлях, але й за різних патологічних станів, що супроводжуються оксидативним стресом. За гіперпродукування АФО ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot} , H_2O_2 , O_3 , $ONOO^-$, інші) утворюються чисельні альдегіди через поліольний шлях пероксидації жирних кислот, спектр цих РКС включає насичені альдегіди (етаналь, пропаналь, гексаналь) та ненасичені (акролеїн, 4-гідрокси-2-ноненаль і 4-гідрокси-2-гексеналь), а також дикарбоніли (гліюксаль, метилгліюксаль, малоновий діальдегід та діацетил) [58]. Останні легко утворюють зшивки в протеїнах і

тому є особливо небезпечними. Ці альдегіди в організмі також здатні неензиматично взаємодіяти з протеїнами та утворювати необоротно модифіковані КПЛ [59]. Утворення КПП і КПЛ під впливом вказаних реактивних альдегідів, в свою чергу, супроводжується інтенсивним генеруванням АФО, що призводить до самоприскорювання цього процесу [60]. КПП і КПЛ прямо або через специфічні рецептори впливають на сигнальну трансдукцію, змінюють структуру і функції протеїнів, як рецепторних, так і позаклітинного матриксу, ензимів метаболічних перетворень та антиоксидантного захисту; викликають запалення й апоптоз, відіграють провідну роль, як вже відмічалось, в патогенезі низки хронічних захворювань [61-63].

Окиснювальний стрес є наслідком використання кисню при аеробному диханні живими організмами і позначається як стійкий стан дисбалансу між генеруванням АФО та здатністю ендогенної антиоксидантної системи їх детоксифікувати. Теорія окиснювального стресу знайшла підтвердження в багатьох дослідженнях на тваринах, які продемонстрували, що підтримка клітинного гомеостазу, біомолекулярної стабільності та цілісності є вирішальними факторами для довголіття клітин та неускладненого старіння. Мітохондрійна дисфункція, порушення гомеостазу протеїнів (протеостази), зміни в дії факторів транскрипції, таких як Nrf2 і NF-κB, і порушення механізмів контролю якості протеїнів, що включає молекулярні шаперони, убіквітин-протеасомну систему та аутофагію/лізосомний шлях, спостерігаються під час старіння та вікових хронічних захворюваннях [64].

Раніше було показано, що КПП є сполуками з надзвичайно неоднорідною групою модифікацій бічного ланцюга амінокислотних залишків протеїнових молекул, тому точна характеристика КПП не виявляється можливою. Для більш глибокого розуміння кінетики та формування структури КПП, їх характеризують за ступенем модифікації, специфічними модифікаціями бічного ланцюга, характеристиками оптичного

поглинання та флуоресценції, а також за змінами структури та молекулярної маси лізину та аргініну у складі альбуміну сироватки людини (ЛСА), який попередньо інкубували з різними концентраціями глюкози, метилглюксалою та гліоксилової кислоти. Молекулярну масу отриманих КПП зазвичай визначають за допомогою матричної лазерної десорбції/іонізації мас-спектрометрії (MALDI-TOF MS) в часі. Порівняння більш ранніх результатів щодо ступеня модифікації бічного ланцюга лізину та аргініну, а також даних флуоресценції та оптичного поглинання, характерних для КПП, виявило, що молекулярні маси цих амінокислот поступово збільшуються, не досягаючи плато, зі збільшенням концентрації індивідуального модифікатора. Таке збільшення молекулярної маси строго корелює зі специфічним для КПП поглинанням при 360 нм та зі ступенем модифікації бічного ланцюга [56].

КПП можуть утворюватися ендогенно, а також виявляються у складі екзогенних джерел (харчування, куріння та ін.). [65, 66]. Підвищений рівень КПП утворюється при термічній обробці їжі, а побуріння продовжується під час зберігання. Різні попередники КПП утворюються під час початкової, проміжної та кінцевої стадій реакції Майяра, і, залежно від їх складу та розміру молекул, різні КПП утворюються в низці реакцій, що включають енолізацію, дегідратацію, циклізацію, фрагментацію та окиснення. До таких сполук відносять піралін, N-ε-карбоксиметиллізин (КМЛ), N-ε-карбоксиетиллізин (КЕЛ), пентозидин, аргпіримідин, похідні МГ (гідроїмідазолони, отримані з МГ, ГЛ), 3-дезоксиглюкозон (3-ДГ), похідні N-δ-орнітину та біс-(лізил)-імідазолію, такі як метилглюксальлізиндимер (МОЛД) та гліоксальлізиндимер (ГОЛД) [65, 67]. Серед них N-ε-карбоксиметиллізин, пентозидин та фуросин розглядаються як поширені КПП в продуктах харчування та плазмі крові людини [68, 69]. N-ε-карбоксиметиллізин визнано найпоширенішим КПП, що використовується як клінічний маркер цих протеїнових модифікацій у плазмі крові людини [70].

КПП можна розділити на три категорії відповідно до їх здатності створювати поперечні зшивки в протеїнах і флуоресціювати: 1) флуоресцентні, ті, що утворюють зшивки (пентозидин та крослін); 2) нефлуоресцентні, ті, що утворюють зшивки (поперечні зв'язки між: імідазолієм та дилізином, алкілформілглікозилпіролом та аргінінлізинімідазолом); 3) ті, що не утворюють зшивки (піралін, КМЛ та КЕЛ) [71]. Через складність та неоднорідність формування КПП *in vivo*, структури цих зшитих сполук не були визначені повністю.

Деякі дослідники також класифікують КПП за ступенем токсичності. Такі сполуки, як КМЛ, КЕЛ та піралін, вважаються нетоксичними КПП. Токсичні КПП зазвичай отримують з гліцераальдегіду або глікольальдегіду. Однак структури токсичних КПП залишаються невизначеними [72, 73]. Хоча КМЛ не утворює зшивок, у зв'язку з чим цей КПП був віднесений до нетоксичних, останні дослідження показали патогенетичну роль цієї модифікованої сполуки, на користь чого свідчило, що КМЛ через рецептор КПП може впливати на клітинне сигналювання, спричиняти стрес та травмування клітин, і, таким чином, призводити до патологічної дисфункції ендотелійних клітин та апоптозу макрофагів [74, 75].

Безпосередні токсичні ефекти КПП зумовлені зміною структури та функції протеїнів плазми та позаклітинного матриксу шляхом глікування та зшивання. Глікування протеїнів впливає на їх нормальну функцію, і, як наслідок, порушує молекулярну конформацію, втручається у рецепторну функцію та змінює активності ензимів. Крім того, КПП зшиваються не тільки з протеїнами, але і з іншими внутрішньоклітинними та позаклітинними молекулами, такими як ліпіди та нуклеїнові кислоти, що призводить до структурних та функціональних порушень [71]. Зміни швидкостей ензиматичного протеолізу та деградації деяких протеїнів, таких як еластин та колаген, можуть призвести до їх накопичення у позаклітинному матриксі, і, як наслідок - до зміни адгезії та росту клітин [76, 77]. Це зумовлює

зменшення еластичності як артеріальної, так і шлуночкової стінок, викликаючи зменшення судинної та міокардіальної функції, характерне для старіння та діабету [78].

Деякі структурні протеїни з тривалим часом півжиття більш схильні до накопичення КППГ через повільну здатність до оновлення. Оскільки ці протеїни забезпечують основу для більшості паренхіматозних органів, як у фіброзній формі, так і в базальній мембрані, їх глікування та накопичення КППГ може призвести безпосередньо до патологічних наслідків. Так, КППГ зменшують розчинність колагену та посилюють його жорсткість [79]. У позаклітинному матриксі нирки накопичення КППГ в колагені може спричинити зміни еластичності його фібрил, іонного заряду, товщини та заміни компонентів базальної мембрани, а отже, вплинути на функцію нирки [80]. Накопичення КППГ в кістці може впливати на їх міцність і призвести до крихкості скелета за рахунок зниження в'язкості кісткової тканини та підвищення її жорсткості [81, 82]. Неензиматичне глікування колагену також негативно впливає на ремоделювання кісток і перешкоджає диференціюванню остеобластів [71, 83, 84].

Таким чином, і КППГ, і КПЛ відіграють ключову роль у реакції клітин на індукування окиснювального та карбонільного стресу через регулювання різноманітних сигнальних шляхів, функціонування, пошкодження та загибелі клітин.

1.3 Гальмування процесів модифікування протеїнів, опосередкованих альдегідами

Дослідження участі РКС у розвитку патологічних процесів, що призводять до багатьох захворювань, наводять на думку про пошук препаратів, які могли б полегшити перебіг гіперкарбонільного стану. Токсичну дію, як самих РКС, так і аддуктів, що виникають в процесі утворення КППГ та КПЛ, можуть нівелювати певні сполуки, як за рахунок їх селективної дії, так і неспецифічного зв'язування. Вплив на генерування

токсичних аддуктів може відбуватися на всіх етапах утворення РКС, починаючи зі знешкодження самих РКС та АФО, блокування каскаду перетворень продуктів Амадори, і закінчуючи протидією та ліквідуванням самих КПП та КПЛ. Тому, актуальним завданням біомедицини є пошук препаратів, які зменшують вміст та вплив РКС на різних етапах розвитку патологічних станів.

Однією з перспективних терапевтичних стратегій є детоксифікування РКС карбонільними пастками. До найбільш вивчених речовин-детоксикантів належать аміногуанідин, гідразин, піридоксамін та карнозин. Аналіз та порівняння їх активності щодо чотирьох РКС (4-гідрокси-транс-2-ноненалю, метилгліоксалу, гліоксалу та малонового диальдегіду) виявили здатність цих пасток запобігати карбонілюванню протеїнів, що оцінювалось *in vitro* інноваційним методом мас-спектрометрії високої роздільної здатності (HRMS) в часі. Реактивність сполук залежала від хімічної будови РКС: карнозин ефективно гасив 4-гідрокси-транс-2-ноненаль, піридоксамін був особливо активним у відношенні малонового диальдегіду, аміногуанідин був активним щодо метилгліоксалу та гліоксалу, а гідразин ефективно блокував усі РКС. Молекулярним моделюванням було показано, що реактивність контролюється за допомогою конкретних стереоелектронних параметрів, які можна використовувати для раціонального конструювання вдосконалених карбонільних пасток [85].

За умов утримання щурів у стані напівневагомості, який індукував у них оксидативний стрес, було показано, що вживання аміногуанідину тваринами стримувало підвищення МДА та зміни вмісту тканинного глутатіону в порівнянні з цими показниками у тварин, що перебували у стресовому стані, але без вживання даної сполуки. Автори говорять про потенційне застосування аміногуанідину в раціоні космонавтів, що перебувають у стресових умовах [86].

Мідьзалежні амінооксидази, такі як САО та ДАО плазми крові, інгібуються хелатуючими агентами, семікарбазидом або аміногуанідином. Вважається, що ці ензими здатні «детоксифікувати» ксенобіотичні аміни. Водночас, при цьому утворюється низка токсичних альдегідів (залежно від субстрату), H_2O_2 і NH_3 , і, як наслідок, відбувається агрегація протеїнів, характерна для судинних порушень за широкого спектру захворювань. Інгібітори амінооксидаз зазвичай запобігають утворенню цитотоксичних продуктів окисного дезамінування поліамінів. В даний час аміногуанідин є єдиним інгібітором САО, який використовується в клініці [25].

Встановлено взаємозв'язок між обміном ФА та біохімічними показниками, які характеризують стан про- та антиоксидантної систем, а також обміну оксиду азоту за субхронічного введення семікарбазиду для зменшення рівня формальдегіду (ФА) в організмі. За умов патології, яку було індуковано семікарбазидом, в організмі щурів значно посилювалися процеси утворення АФО, вільних радикалів, нітритів та нітратів на тлі зменшення рівня альдегідів, що пов'язано з акцепторними властивостями семікарбазиду, а також з гальмуванням синтезу ФА та прискоренням його перетворення на форміат. Також було зроблено припущення, що даний альдегід може відігравати певну роль у формуванні сполучнотканинних патологічних станів [87].

Відомо, що гідразин виявляє основні властивості завдяки неспареним електронам атому азоту, та в кінетичних дослідженнях зі структурно-різноманітними альдегідами у водному буфері при рН 7,4 утворює з підвищеною швидкістю гідразони. Константи швидкості для найінтенсивніших комбінацій карбонілу/гідразину становлять $2-20 \text{ c}^{-1}$. Відносно ранніх, менш селективних реакцій, останні значно покращують здатність утворювати кон'югати біомолекул, особливо у клітинному середовищі при рН 7,4 за низьких концентрацій [88].

Для зв'язування альдегідів за умов *in vivo* як акцептор альдегідів використовували димедон. Розвиток карбонільного стресу як результат гіперпродукування альдегідів є наслідком, головним чином, двох процесів: перекисного окиснення ліпідів і неферментативного глікування протеїнів. Було зроблено припущення, що пул ендогенних альдегідів може суттєво впливати на кінцеві показники оксидативного стресу. На експериментальних моделях на щурах (гліцерол-стимульований рабдоміоліз - модель оксидативного стресу, та стрептозотоцин-індукований діабет - модель моносахаридного стресу) було показано роль альдегідів у формуванні таких показників оксидативного стресу як вміст СО-груп протеїнів, ТБК-позитивних продуктів, відновлених SH-груп низькомолекулярних сполук, карбоксиметиллізину, що свідчить про розвиток в тканинах експериментальних тварин карбонільного стресу та його зв'язок з оксидативним стресом. На обох моделях за умов введення щурам димедону (10 мл/кг маси тіла) показано зниження загального вмісту альдегідів у печінці в 4,7 рази (рабдоміоліз) та у 3 рази (діабет), а також показників оксидативного стресу у порівнянні з контролем [89].

Відомо, що останнім часом робиться акцент на використання натуральних продуктів та їх похідних у запобіганні утворення альдегід-індукованих КПП, формування та накопичення яких визнано основним патогенетичним чинником за діабетичних ускладнень, атеросклерозу та серцево-судинних захворювань. Крім того, повідомлялося, що АФО та вільні радикали беруть також участь у формуванні КПП та пошкодженні клітин. Натуральні продукти з антиоксидантною та анти-антигенною активністю мають великий терапевтичний потенціал при лікуванні діабету, гіпертонії та їх супутніх ускладнень. Результати випробування етанольних екстрактів та традиційних водних препаратів рослин, які використовуються для лікування діабету, гіпертонії та ожиріння в традиційній медицині Юкатекан, щодо їх протидії утворенню КПП та вільних радикалів, засвідчили, що виявлені

активні метаболіти знищують радикали та відрізняються від тих, які беруть участь у інгібуванні утворення КПП. Таким чином, екстракти з антиоксидантною активністю можуть містити метаболіти, здатні запобігти утворенню КПП за допомогою іншого механізму [90]. В гомогенаті сім'ядоль чайного насіння, а також інших рослин (сої, квасолі, рису, огірків та японської редьки) було виявлено та досліджено потужну сполуку, яка синтезується під час дозрівання насіння і є інгібітором утворення С6-альдегідів (гексаналь, цис-3-гексеналь, транс-2-гексеналь, транс-2-ноненаль, транс-2-, цис-6-нонадієналь - важливі смакові компоненти, що впливають на якість рослинної продукції) з ненасичених лінолевої та ліноленової кислот [91].

Існують дані, про низку препаратів, до складу яких входять амінокислоти або їх похідні, які виявляють протекторні властивості від глікувальних агентів та їх аддуктів.

На численних моделях онкологічних захворювань, інтоксикації ксенобіотиками та інших клітинних стресових станах показано хіміопротекторну ефективність N-ацетилцистеїну (N-АЦ), який зазвичай використовується для знешкодження АФО. Однак доведено, що висока константа дисоціації SH-групи N-АЦ не сприяє інактивації основних первинних АФО, таких як H_2O_2 та $O_2^{\cdot-}$, але дає можливість через реакцію водню з тіолами нівелювати дію високотоксичного гідроксильного радикалу ($\cdot OH$). Висока антиоксидантна активність N-АЦ може бути пояснена нещодавно з'ясованим механізмом утворення даною сполукою гідроперсульфідів (RS-SH). Цьому процесу передувало його деацетилювання в цистеїн, який зазнавав подальших ензиматичних перетворень. Було зроблено припущення, що утворення персульфідів може бути специфічним для клітин та піддаватися метаболічному контролю [92].

PKC, індуковані внаслідок окиснення ліпідів за участі АФО, можуть дифундувати в клітині і пошкоджувати різні мішені. Токсичність α, β -

ненасичених альдегідів, таких як акролеїн, кротоновий альдегід та 4-гідрокси-2-ноненаль, зумовлена їх високою реакційною здатністю відносно SH-груп протеїнів за рахунок утворення продуктів Майяра при посередництві β -вуглецю подвійного зв'язку ($R-CH=CH-CHO$). Здатність до перенесення електронів карбонільних груп збільшує електрофільність β -вуглецю та його сприйнятливості до утворення продуктів Майяра. Ензиматичні процеси для елімінації α,β -ненасичених альдегідів значно менш ефективні в порівнянні з такими для АФО, що значно збільшує їх рівень в клітинах. SH-група N-АЦ швидко утворює аддукти Майяра з α,β -ненасиченими альдегідами, запобігаючи їх кон'югуванню з протеїнами, чим перешкоджає токсичну дію цих сполук. Елімінування реактивних електрофільних сполук (особливо сильних акцепторів реакції Майяра) є ефективним хіміопротекторним підходом, який проте часто ігнорують. Надмірна кількість SH-реактивних електрофілів та гальмування антиоксидантної ензиматичної активності також можуть призвести до підвищених рівнів АФО, і в цьому випадку N-АЦ буде пригнічувати вміст останніх шляхом їх зв'язування. Загалом, потужна хіміопротекторна ефективність N-АЦ, особливо у клітинній культурі, де у позаклітинних середовищах відсутні недоокиснені тіоли, може бути пов'язана з плеїотропними механізмами дії даної сполуки. Позитивний ефект застосування N-АЦ у багатьох випадках, ймовірно, вказує на наявність реактивних електрофільних сполук, а не первинних АФО [93].

Інші механізми, які можуть сприяти хіміопротекторній дії N-АЦ, полягають у поповненні пулу глутатіону внаслідок клітинної доставки цистеїну (утворюється після деацетилювання N-АЦ) та зменшенні дисульфідних зв'язків у протеїнах. Завдяки більшій нуклеофільній активності N-АЦ інтенсивніше знижує утворення дисульфідних зв'язків, ніж цистеїн або глутатіон. Біосинтез глутатіону регулюється за механізмом негативного зворотного зв'язку, що ускладнює підвищення глутатіону вище його

фізіологічних рівнів (3–10 мМ) за рахунок приймання N-АЦ. Існують дані, що за впливу ендогенних амінотіолів (цистеїну, N-АЦ та глутатіону) відбувається деактивація ДНК-аддукту, який відповідає за ініціювання процесу розвитку карциноми [94].

Неензиматичне глікування макромолекул, особливо протеїнів, як відзначалось вище, відіграє важливу роль при різноманітних захворюваннях. Глікування протеїнів на ранніх стадіях розвитку патологічних станів сприяє утворенню стабільного продукту амадорлізину, який зазнає подальших незворотних хімічних перетворень з генеруванням КПП. Відомо, що протеїни, багаті лізином, такі як колаген та альбумін сироватки людини, відіграють провідну роль у старінні та вікових захворюваннях. Антигенна характеристика глікованих залишків лізину в цих протеїнах разом з наявністю сироваткових автоантитіл до глікованих продуктів лізину та протеїнів, багатих лізином, у хворих на діабет та артрит вказує на те, що ці модифіковані залишки лізину можуть бути новим біомаркером глікування протеїнів за цих умов [95]. Лізин виявляє противірусну дію, підтримує енергетичний баланс, перетворюючись в карнітин, бере участь у формуванні колагену та відновленні тканин, покращує засвоєння кальцію і його транспорт в кісткову тканину, попереджає утворення ліпопротеїдів, сповільнює пошкодження хрусталика за діабетичної ретинопатії. За фізіологічних рН в спонтанній реакції з ФА відбувається метилювання ϵ -аміногрупи L-лізину [96], яке можна інгібувати L-аскорбіною кислотою [97].

Цитотоксичні похідні поліамінів, аміноальдегіди, що утворюються під час церебральної ішемії, пошкоджують сусідні тканини, на які не впливає первинний ішемічний інсульт. Одним із таких продуктів є 3-амінопропаналь (3-AP), потужний цитотоксин, який накопичується в мозку за ішемії. Водночас, точні механізми, що відповідають за його утворення, досі не з'ясовані. Аміно- та карбонільні групи 3-AP зумовлюють його токсичність:

аміногрупа індукує лізосомотропізм, а альдегід є важливим для додаткових, на сьогодні невідомих реакцій. Було зроблено припущення, що 3-AP, маючи структуру слабкої лізосомотропної основи, може концентруватися в лізосомах, тим самим перетворюючись на джерело первинної токсичності. Дійсно, 3-AP призводить до руйнування лізосом клітин гліоми D384, запускаючи процес, який явно передуює активації каскаду каспаз та загибелі апоптотичних клітин. За допомогою імуногістохімічного барвлення показано, що 3-AP концентрується в лізосомах, а запобігання цьому накопиченню за посередництва лізосомотропної основи NH_3 захищає від цитотоксичності 3-AP шляхом підвищення лізосомного рН. Тіолова сполука, N-(2-меркаптопропіоніл)-гліцин, вступає в реакцію з 3-AP, нейтралізує його і, таким чином, нівелює його цитотоксичність [42].

L-гліцин - важливий для нейромедіації та синтезу замінних амінокислот, прискорює глікогеноліз в печінці з метою енергозабезпечення м'язів, клітин імунної і нервової систем, бере участь в синтезі гемоглобіну, пуринових нуклеотидів, жовчі та у відновленні скелетно-сполучної системи; має виражену седативну, ноотропну, антистресорну та детоксикувальну дію. Також ця амінокислота має високу фізіологічну активність щодо процесів остеогенезу і внутрішньоклітинного метаболізму, впливає на мінералізацію кісткової тканини та синтез колагену *de novo*, що становить органічну складову кісткової тканини, активує анаболічні процеси, нормалізує кислотно-лужну рівновагу, сприяє усуненню остеопорозів, бревіспондилій початкових стадій, деформувального артрозу, нормалізує стан печінкової тканини при гепатитах, індукованих агресивною хіміотерапією за лікування онкологічних захворювань, не викликає алергічних реакцій, легко та швидко метаболізується, добре переноситься організмом у великих кількостях.

За різних захворювань внаслідок утворення КПП відбувається втрата органами їх функціональних можливостей, що безпосередньо може бути пов'язано з мітохондрійною дисфункцією. Дію низки сполук пов'язують з

можливістю відновлення сигналювання, залученого до контролю метаболічних шляхів, та блокування утворення аддуктів пов'язаних з КПП. Так, карнозин, дипептид, що складається з амінокислот гістидину та β -аланіну, як і антиоксидантний N-АЦ блокував МДА-індуковане зшивання протеїнів, що може полегшувати перебіг нейродегенеративних захворювань (Альцгеймера, Паркінсона) [98].

Бенфотіамін, синтетичне S-ацилпохідне тіаміну (вітаміну B₁) внаслідок анти-КПП активності зменшує інтенсивність перебігу запальних процесів за діабету, в результаті зменшується пошкодження ендотелійних клітин артерії [99]. Дані літератури вказують на ефективність бенфотіаміну щодо КПП за діабетичної нейропатії, ретинопатії та нефропатії [100].

Піридоксаль 5'-фосфат (метаболіт вітаміну B₆), протидіє глікуванню, нейтралізуючи ліпоперекиси, що стимулюють утворення КПЛ за умов розвитку діабету [101].

Детоксикувальними властивостями антиоксидантного характеру відносно КПП володіють також біофлавоноїд лютеолін [102], піролохінолін хінон [103] та таурин [104] внаслідок відновлення мітохондрійного біогенезису.

Біобезпечність препаратів, які використовуються в дослідженнях на різних моделях, є необхідною передумовою перспективності їх застосування та дозволяє не тільки ефективно інгібувати формування КПП, а й уникнути негативних наслідків ксенобіотичного характеру. Специфічність та безпечність сполук, які інгібують утворення як самих РКС, так і їх аддуктів на різних етапах перетворення, є важливим завданням сучасної біомедичної науки, з подальшим використанням їх у терапевтичній практиці.

1.4. Клінічне значення показників альдегід-залежної модифікації протеїнів

Відомо, що життєдіяльність організму забезпечується наявністю сигналів, що постійно регулюють перебіг метаболічних процесів

підтримуючи баланс біологічної системи. Порушення такого балансу може бути поштовхом до виникнення багатьох захворювань, в тому числі і онкологічних. При цьому, внаслідок впливу, в тому числі й альдегідів, відбуваються зміни структури протеїнів, що в свою чергу призводить до змін у сигналюванні (порушується транспортна, ензиматична, рецепторна та інші функції), що потребує необхідних додаткових досліджень.

Рабдоміоліз (РМ) – патологічний стан, що спричинений пошкодженням м'язів, характеризується вивільненням вмісту м'язових клітин (електроліти, міоглобін та інші саркоплазматичні протеїни) в кров'яне русло, що індукує потужний оксидативний стрес. Міоглобін крові фільтрується клубочками нирок і з'являється в сечі (міоглобінурія), що супроводжується порушенням кровопостачання ниркової кори і зменшенням клубочкової фільтрації. Розвиваються структурні зміни в нирці, головним чином, у її каналцях. Наслідком цього є гостра ниркова недостатність, яка виникає приблизно через 24-48 годин після початкового пошкодження м'язів, незалежно від виду чинника, який спричинив даний патологічний стан, та є домінуючим проявом даної патології. Ступінь розвитку РМ може коливатись від субклінічної форми з підвищенням активності креатинкінази до критичного клінічного стану з набряком інтерстиції м'язових клітин, скороченням об'єму внутрішньосудинної рідини та нефропатією з розвитком гострої ниркової недостатності [105]. Головними патофізіологічними механізмами гострої ниркової недостатності, що виникає при РМ, є вазоконстрикція, утворення внутрішньоканальцевих циліндрів і пряма цитотоксична дія гемі. Міоглобін легко фільтрується через базальну мембрану клубочків і акумулюється в ниркових каналцях. Внаслідок реабсорбції води концентрація міоглобіну в просвіті каналців значно підвищується, він починає осаджуватись з утворенням циліндрів, які обтурують каналці [106]. Обструкція ниркових каналців кристалами сечової кислоти зумовлена високою швидкістю її продукування і екскреції з сечею. Іншим фактором, який сприяє осадженню

міоглобіну і сечової кислоти є низький рівень рН каналцевої сечі внаслідок ацидозу. Крім того, за розвитку РМ може відбуватись індукція імунної відповіді внаслідок виникнення в м'язах запальних процесів. Запалення пов'язане з посиленням проліферативних процесів, тобто зі зростанням синтезу ДНК та протеїнів, що, в свою чергу, потребує підвищених рівнів поліамінів. З клітин може вивільнятися медіатор запалення гістамін та інші біогенні аміни. Ці сполуки утворюються з амінокислот, за фізіологічних умов існують у вигляді полікатіонів та беруть участь у розвитку різноманітних патологій [107]. За розвитку РМ спостерігається багаторазове підвищення концентрації креатину та саркозину, які є попередниками утворення метиламіну. В результаті окисного дезамінування метиламіну за участі САО, інших біогенних амінів та поліамінів за участі ПАО та ДАО утворюються відповідні альдегіди та пероксид водню, підвищені концентрації яких спричиняють оксидативний та карбонільний стреси.

Терміном «діабет» зазвичай об'єднують низку метаболічних захворювань, що характеризуються розвитком гіперглікемії внаслідок порушень секреції або дії інсуліну і супроводжуються гіперглікемією та поліурією. Хронічна гіперглікемія пов'язана з довготривалим ураженням та порушенням нормального функціонування різних органів, зокрема очей, нирки, серця, нервової системи та кровоносних судин. [108]. Хронічне ураження тканин при цукровому діабеті включає як окисну модифікацію протеїнів, ДНК та ліпідів під дією АФО та активних форм нітрогену (АФН), так і хімічну модифікацію протеїнів продуктами окиснення моносахаридів та ліпідів. При цьому утворюються КПП та КПЛ [109, 110]. Підвищення рівня глюкози індукує метаболічні та фізіологічні процеси, які за механізмами реалізації можуть бути подібні як в підшлунковій залозі та в периферичних тканинах, так і відрізнятись в тканинах з різною функціональною спеціалізацією [111]. При діабеті підвищуються рівні альдегідів з низькою молекулярною масою, таких як ГЛ, МГЛ, 3-ДГ та глікоальдегід [112].

Глікоальдегід може утворюватися з глюкози та внаслідок окиснення амінокислот [113], ГЛ - при окисненні глюкози [114], а МГЛ - внаслідок деградації глюкози, гліцеролфосфату, гліцеральдегід-3-фосфату, ацетону, аміноацетону та окиснення амінокислот [115]. Підвищення рівнів альдегідів відбувається через активне генерування цих сполук або через зниження функціональної активності системи захисту [116]. Система захисту, що включає гліоксалази (I і II) та альдозоредуктази, зазвичай ефективно елімінує альдегіди, але при діабеті і, тим більше, при розвитку ускладнень діабету ці системи не здатні адекватно реагувати на швидке генерування реакційноздатних альдегідів [117]. До особливо реакційноздатних альдегідів належать ГЛ та МГЛ, які генеруються при автоокисненні глюкози за гіперглікемії і є причиною ускладнень за розвитку цукрового діабету. За цієї патології відбувається порушення обміну вуглеводів та процесів карбонілювання, а також формуються реакційноздатні КПП.

Останнім часом «блакитна» автофлуоресценція поверхні шкіри пацієнтів використовується як маркер інтенсивності процесів постсинтетичної модифікації протеїнів та накопичення кінцевих продуктів ліпидування та глікування [118, 119]. Вважається, що цей показник є прогностичним для розвитку низки патологій, що асоційовані з посиленням протеїнових модифікацій, таких як кардіоваскулярні, нейродегенеративні, ниркові захворювання, ускладнення діабету тощо.

Латиризм – захворювання, що розвивається у людей і тварин при вживанні насіння хіни або горошку сійного *Lathyrus* з сімейства *Papilionaceae*, яке містить β -амінопропіонітрил, що призводить до незворотних ушкоджень скелета та сполучної тканини у вигляді викривлень хребта, дегенеративних артритів, аневризми аорти, порушень синтезу та структури колагену й еластину [120]. Відомо, що латиризм експериментально відтворюється дією не тільки β -амінопропіонітрилу, але і таких хімічних сполук, як семікарбазид, гідразиди, гідразини, карбазати та дитіокарбамати.

Дослідження механізмів семікарбазид-індукованого латиризму і досі є актуальним, оскільки продукти харчування можуть бути забруднені семікарбазидом, як похідною від харчової добавки азодикарбонаміду, що використовується у хлібопекарському виробництві [121]. Експериментальна модель латиризму також застосовується для вивчення змін у структурі кісток і позаклітинного матриксу під дією різних чинників [120, 122, 123]. Як відомо, основним механізмом розвитку латиризму є інгібування активності лізілоксидази (ЛО) – ензиму з Cu-вмісним каталітичним центром, який відповідає за утворення міжмолекулярних зшивок у колагені та еластині завдяки окисному дезамінуванню ϵ -аміногруп лізинових і гідроксилізинових залишків. В останні роки цей ензим привертає до себе все більшу увагу завдяки своїй основній функції, здатності контролювати структуру позаклітинного матриксу [124, 125]. Показана його причетність до індукування клітинної міграції та адгезії [126, 127] та метастазування пухлин [128]. Оскільки інгібітори лізілоксидази здатні знижувати метастатичний потенціал малігнізованих клітин, їх використання є перспективним для розробки антиметастатичних препаратів [129, 130]. Щодо неензиматичного зшивання, то відомо, що формальдегід бере участь в утворенні міжпротеїнових зшивок і здатен впливати на стан позаклітинного матриксу [131, 132, 133].

Збільшення щільності сполучної тканини стає причиною приблизно 30% випадків виникнення онкологічної патології. Щільна сполучна тканина характеризується підвищеним депонуванням протеїнів позаклітинного матриксу (ПКМ) і фібробластів у стромі, які оточують епітелійні клітини, і це в 4-6 разів збільшує ризик виникнення онкології [134]. Встановлено, що процес метастазування визначається мікрооточенням пухлини. У його формуванні беруть участь не тільки клітини первинної пухлини, але й безліч незлоякісних клітин стромы, що генерують значну кількість сигнальних молекул, залучених до прогресії онкологічного процесу. Так,

процеси депонування, посттрансляційної модифікації та ремоделювання локального позаклітинного матриксу, що відбуваються за участі ензиму ЛО, є надзвичайно важливими як на первинних, так і на вторинних локаціях злякисного процесу. Функціонування цього ензиму призводить до перебудови локального мікрооточення первинних пухлин та формування преметастатичної ніші в органах-мішенях, яку згодом колонізують пухлинні клітини з формуванням вторинних метастазів.

До складу гетерогенної родини мідьвмісних ензимів лізілоксидаз крім самої ЛО також входять ЛО-подібні ензими (LOXL, LOXL1, LOXL2 та LOXL3) [135]. Структурна ідентичність високо консервативних ділянок зв'язування іонів міді та лізил-тирозилхінонових кофакторів у ЛО та ЛО-подібних протеїнах вказує на подібність їх основної аміноксидазної активності. Лише для деяких членів цієї родини, а саме ЛО та LOXL2, нещодавно встановлено функцію регулювання пухлинного росту. Численні дослідження свідчать про участь LOXL2 в інвазивності ракових клітин, а також в процесах метастазування та ангиогенезу [136]. Показана причетність ЛО до гіпоксичного канцерогенезу та доведено протипухлинну ефективність пригнічення синтезу ЛО антитілами або мікроРНК [137]. Саме тому пошук ефективних інгібіторів ЛО може бути корисним у розробці протипухлинних терапевтичних засобів.

Відомо також, що за умов злякисного росту в тканинах-мішенях багаторазово зростає концентрація біогенних амінів і поліамінів [138, 139]. Ця ланка метаболізму є одним із важливих чинників оксидативного та карбонільного стресу, що, як наслідок, призводить до розвитку патологічних станів людини і тварин. З огляду на це, підвищення активності та рівнів експресії амінооксидаз може бути одним з маркерів патології, зокрема злякисного росту. Тому важливо оцінювати рівень активності цих ензимів (САО, ДАО і ПАО), дія яких пов'язана з запальними процесами. САО відома також як судинний адгезивний протеїн типу 1, який бере безпосередню

участь у інфільтрації клітин запалення (лейкоцитів, нейтрофілів) в пошкоджені тканини. А оскільки хронічне запалення вносить вклад до розвитку онкологічного процесу, то цей ензим причетний до канцерогенезу. Також відомо, що активність САО у сироватці крові хворих на рак легені має високий ступінь кореляції з вмістом епідермального фактора росту, залученого до процесів ангиогенезу [140]. Крім того, на сьогодні встановлено, що до процесів канцерогенезу причетні кавеолі – особливі ділянки плазматичної мембрани, та протеїни, що є їх компонентами. Одним з них є САО [141], що також підтверджує безпосередню участь цього ензиму в розвитку онкології. На користь цього свідчить і те, що пухлинна тканина безпосередньо екскретує ендogenousний формальдегід, одним з джерел утворення якого в клітині є САО [142].

Встановлено, що активності двох катаболічних амінооксидаз – ДАО і ПАО підвищені під час швидкого росту пухлин. ДАО каталізує оксидативне деамінування путресцину з утворенням γ -амінобутиральдегіду. ПАО каталізує окислення спермідину і сперміну до путресцину і утворює при цьому в еквімолярній кількості два цитотоксини - альдегід 3-амінопропаналь і пероксид водню. Тобто даний ензим бере участь у зворотній конверсії поліамінів, і його функціонування є важливим для гомеостазу поліамінів, тоді як регулювання активності цього ензиму може відігравати важливу роль в підсиленні апоптозу злоякісних клітин [143]. Крім того, ДАО є основним ензимом, за участі якого відбувається деградація гістаміну, біогенного багатофункціонального аміну, що бере участь в імунній відповіді, запаленні та пухлинному рості. Численними дослідженнями показано, що злоякісні клітинні лінії та експериментальні пухлини містять високі концентрації ендogenousного гістаміну, який вивільняється в міжклітинний простір. Таким чином, підвищена активність даного ензиму відповідає високій концентрації цього моноаміну за умов канцерогенезу [144].

АФО, які постійно генеруються в організмі й задіяні в багатьох ланках чисельних регуляторних шляхів, також вносять вклад до розвитку низки патологічних станів, в тому числі й онкологічних захворювань. З іншого боку, накопичено чисельні експериментальні докази того, що АФО можуть також пригнічувати виживання пухлинних клітин [145]:

- вони регулюють кожен етап розвитку пухлини, в тому числі трансформацію, виживання, проліферацію, інвазію, метастазування та ангиогенез;
- регулюють хронічне запалення, один з основних медіаторів онкологічного процесу;
- регулюють функціональну активність сигнальних молекул, що контролюють прогресію клітин в клітинному циклі;
- експресія низки генів-супресорів пухлин знаходиться під контролем АФО;
- високий рівень АФО може пригнічувати ріст пухлини шляхом суттєвої активації інгібіторів клітинного циклу;
- більшість доступних в даний час хімотерапевтичних та радіотерапевтичних засобів знищують пухлинні клітини за рахунок підсилення оксидативного стресу.

АФО, які утворюються за умов онкології у надмірних концентраціях, діють як месенджери активації сигнальних шляхів (NF- κ B та p38 MAPK), що регулюють проліферацію, диференціювання та апоптоз клітин. Крім того, РКС, що утворюються при пероксидації ліпідів, можуть функціонувати як вторинні патогенні фактори, що спричиняють подальше ураження протеїнів та мембран. Це, в свою чергу, може посилювати оксидативний стрес, утворюючи замкнений цикл. РКС, або альдегіди, також можуть викликати мутації та розриви в ДНК, що також може призводити до індукування злоякісного росту. Функціональні наслідки, спричинені альдегідами, можуть

відігравати ключову роль у розвитку патологічних станів різного генезу у разі дефіциту системи їх детоксифікації [146].

Проведений аналіз наявних експериментальних даних свідчить про взаємодоповнення карбонільного стресу оксидативним, і, навпаки, «перетікання» оксидативного стресу в карбонільний. Регуляторна взаємозалежність цих процесів визначає доцільність подальшого дослідження молекулярних механізмів, що лежать в основі реалізації їх ролі у патогенезі низки захворювань. Використання тваринних моделей, які могли б краще та детальніше відтворювати ці патологічні стани, забезпечить процес пошуку потенційних сполук для елімінування токсичних аддуктів з метою полегшення перебігу системних захворювань людини.

РОЗДІЛ II.

Матеріали та методи досліджень

2.1. Модифікування лізину, альбуміну та желатини альдегідами в дослідях *in vitro*

Дослідження проводили *in vitro*, використовуючи препарати: L-лізину; желатини (пептиди колагенової природи); альбуміну сироватки людини. Проби для аналізу відбирали з 1-ої години (лізин) та на 5-у, 10-у, 15-у доби (альбумін сироватки людини) та на 60-у добу (желатина).

2.1.1. Модифікування лізину

Розчин L-лізину (20 мкМ) інкубували з альдегідами: рибозою (РБ), гліоксалем (ГЛ), метилгліоксалем (МГЛ) та формальдегідом (ФА) (20 мкМ кожний) та з їх комбінаціями, в 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37°C в темряві протягом 30 діб. Контролем слугували зразки, в яких були присутні усі складові без лізину.

2.1.2. Модифікування альбуміну сироватки людини (ЛСА)

Розчин альбуміну сироватки людини (ЛСА, 20 мМ) інкубували з альдегідами: рибозою (РБ), гліоксалем (ГЛ), метилгліоксалем (МГЛ) та формальдегідом (ФА) (20 мМ кожний) та з їх комбінаціями, в 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37°C в темряві протягом 30 діб. Контролем слугували зразки, в яких були присутні усі складові без альбуміну.

2.1.3. Модифікування пептидів колагенової природи

Розчин желатини (ЖЛ, 5%) інкубували з альдегідами: рибозою (РБ), гліоксалем (ГЛ), метилгліоксалем (МГЛ), акролеїном (АКР), формальдегідом (ФА) та дезоксирибозою (ДРБ) (20мМ кожний) та з їх комбінаціями, в 0,1 М Na - фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37°C в темряві протягом різних термінів, до 60 діб. Контролем слугували зразки, в яких були присутні усі складові без желатини.

2.2. Умови проведення дослідів *in vivo* на щурах

В модельних дослідах *in vivo* використовували статевозрілих щурів-самців лінії Wistar вагою 55-65 г (латиризм) та 180-250 гр (діабет, рабдоміоліз) та мишей-самців лінії C57B1/6 віком 2-3 місяці, масою 20-24 г (карцинома легені Льюїс), які утримувались на стандартному раціоні віварію. Об'єктом досліджень були зразки плазми крові, тканин печінки, нирки та легені, суглоби, шкіра та кістки. Тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001) та міжнародних вимог згідно з «Європейською конвенцією захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях». У роботі використовували комерційні препарати: альбумін сироватки людини, лізин, гліцин (Reanal, Угорщина), желатина (Fluka, Німеччина). Також було використано реактиви: D-рибоза, ацетилцистеїн (AppliChem GmbH, Німеччина); гліюксаль, метилгліюксаль («Альфарус», Україна); формальдегід, фосфати натрію, азид натрію, хлорид калію, гліцерол (ХімМед, Україна), стрептозотоцин (Sigma, США), цисплатин (Ebewe, Австрія).

2.2.1. Модель гіперкарбонільного стану – гліцерол-стимульований рабдоміоліз (PM)

Моделювання PM шляхом внутрішньом'язевого введення тваринам розчину гліцеролу є добре відпрацьованою моделлю [147]. Дослідження проводили на щурах самцях лінії Wistar. Було сформовано 7 груп по 6 тварин у кожній. Групу №1 склали інтактні щури («Контроль»). Тваринам інших груп (№№2-3) індукували експериментальний PM введенням в обидва стегнові м'язи 50% водного розчину гліцеролу (10 мл/кг). Тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом через: 1 добу (група №2), 3 доби (група №3), 4 доби (груп №№ 6 та 7), 6 діб (група №4), 10 діб (група №5) після введення гліцеролу. Група №7 через 1 добу після ін'єкції гліцеролу

отримувала 20% розчин N-АЦ в дозі 15 мг/кг маси тварини. Для досліджень відбирали зразки крові та тканини печінки.

Визначення біохімічних показників розвитку рабдоміолізу. В тканині печінки визначали гемоксигеназну (ГО) активність за накопиченням білірубину [148], в плазмі – вміст вільного гему піридингемохромним методом [149], креатинкіназну активність – набором «Audit Diagnostics» (Ireland). Білірубін, креатинін, сечову кислоту визначали в плазмі з використанням наборів «Філісіт-Діагностика» (Україна). Лабільний ферум у плазмі крові визначали спектрофотометричним методом з власною модифікацією на основі набору «Філісіт-Діагностика» для визначення феруму. У наборі реактивів замінили гліцин/HCl (0,2 М) на фосфатний буфер, рН 7,4 (0,1 М), оскільки у кислому середовищі гліцин/HCl буферу ферум вивільнюється з ферум-зв'язувальних протеїнів (трансферину). За фізіологічного рН трансферин захищає включений до його складу ферум від хімічної взаємодії. При проведенні реакції при рН 7,4, доступним до хімічної взаємодії є лабільний ферум Fe^{+2} , який потрапляє у кров та у подальшому включається до трансферину; та Fe^{+3} , який може з'являтися при катаболізмі металопротеїнів та «випадає» з фізіологічної схеми обміну [147].

2.2.2. Модель гіперкарбонільного стану – стрептозотоцин-індукований цуровий діабет (СТЦД)

Моделювання діабету I типу проводили за протоколом, описаним в роботі [150] на щурах лінії Wistar. Тваринам три рази з інтервалом у 7 діб інтраперитоніально вводили 1 мл неповного адьюванта Фрейнда, і через 24 години так само вводили стрептозотоцин в 0,5 мл цитратного буферу (рН 4,5). При цьому для першого та третього введення кількість препарату, визначали із розрахунку 25 мг/кг маси тварини, для другого введення – 20 мг/кг. Кожне введення проводили після 12-ти годинного голодування. Через тиждень після останнього введення стрептозотоцину в зразках крові з хвостової вени за допомогою глюкометра «Глюкофот-Плюс» (Україна)

визначили рівень глюкози. За результатами тесту (27 ± 8 ммоль/л глюкози) тварин розділили на 2 дослідні групи з СТЦД по 10 тварин у кожній: групи №2 та №3. Для групи інтактних тварин (№1 – «Контроль») рівень глюкози становив – ($6,5 \pm 1,7$) ммоль/л. Через 10 діб після третього введення стрептозотоцину тваринам групи №3 перорально вводили по 1 мл «Комплексу дієтичну добавку при гіперкабонільному стані» «СТЦД+Добавка») у складі: гліцин - 0,079 г/кг; лізин – 0,1 г/кг; N-ацетилцистеїн 0,025 г/кг маси тварини. Через 1,5 місяця від початку дослідження тварин виводили з експерименту декапітацією під ефірним наркозом відповідно до положень «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001) та міжнародних вимог згідно з «Європейською конвенцією захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» [151]. Для досліджень відбирали зразки крові та тканини печінки.

2.2.3. Модель гіпокарбонільного стану – семікарбазид-стимульований латиризм

Дослідження проводили на 20 щурах-самцях лінії Wistar, масою 55-65 г, що утримувалися на стандартному раціоні віварію і були поділені на дві групи, по 10 тварин у кожній. Щурам дослідної групи в питну воду додавали семікарбазид (0,075%) протягом 45 діб, після чого тварин декапітували. Для визначення вмісту альдегідів, за 1 годину до забою, тваринам кожної групи інтраперитоніально вводили 1%-й розчин димедону в дозі 10 мл/кг. Рентгенологічні дослідження проводили на цифровому рентгенографічному комплексі для ветеринарії «Вател-1», Україна.

2.2.4. Модель карциноми легені Льюїс (КЛЛ)

Для моделювання карциноми легені Льюїс мишам C57BL/6 ін'єкували 1×10^6 клітин КЛЛ у стегнову частину задньої лапи і через 7 днів тварин було поділено на 6 експериментальних груп по 5 у кожній: 1 – інтактні; 2 –

інтактні тварини, які отримували водний розчин креатину (30 г/л); 3 – інтактні тварини, які отримували препарат на основі креатину модифікованого «Добавка дієтична для застосування при онкологічних захворюваннях» у питній формі (30 г/л); 4 - тварини з карциномою легені Льюїс; 5 - тварини з пухлиною, які отримували водний розчин креатину (30 г/л); 6 - тварини з пухлиною, які отримували препарат на основі креатину модифікованого «Добавка дієтична для застосування при онкологічних захворюваннях» у питній формі (30 г/л). Тварин виводили з експерименту на 28 добу шляхом розриву шийних хребців («cervical- spine disruption»).

2.3 Приготування та дослідження ефективності препарату «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» для зменшення наслідків карбонільного стресу

Враховуючи, що альдегіди активно вступають в реакцію з відновленими тіолами (цистеїном, глутатіоном) та аміногрупами протеїнів, було застосовано препарат, який містить гліцин, лізин та N-АЦ, для нормалізації рівня ендогенних альдегідів та зменшення відповідних постсинтетичних протеїнових модифікацій за гіперпродукування альдегідів в організмі. Для якісної оцінки змін, які відбуваються в процесі глікування L-лізину у складі добавки *in vitro*, аналізували спектри флуоресценції після інкубації з глікувальними агентами протягом різних проміжків часу та без агентів (контроль). Утворення хромофорвмісних продуктів глікування L-лізину оцінювали за допомогою спектрофотометричного та флуориметричного методів дослідження. Було проведено порівняльне дослідження накопичення флуоресцентних продуктів за інкубації дієтичної добавки з різними альдегідами та їх комбінаціями.

2.4 Аналітичні методи

Визначення загального вмісту альдегідів у печінці тварин. Загальний вміст альдегідів визначали за допомогою реагенту Purpald (4-аміно-5-

гідразино-1,2,4-тріазол-3-тіол, «Sigma», США) [152]. Осадження протеїнів в гомогенаті тканини печінки проводили з використанням насиченого розчину $\text{Ba}(\text{OH})_2$ та 20% ZnSO_4 та наступним центрифугуванням при 3000 об/хв. Для подальшого визначення відбирали 100 мкл отриманого надосаду. До зразків додавали 50 мкл 0,1% розчину Purpald в 2н. NaOH. Інкубування проводили протягом 15 хв при кімнатній температурі, після чого до зразків додавали 50 мкл 0,07% періодату натрію. Оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі μQuant (Biotek, США) при 550 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували стандартні розчини формальдегіду, які готували безпосередньо перед вимірюванням.

Визначення рівня SH-груп низькомолекулярних сполук. Цей показник визначали в печінці щура флуориметричним методом з використанням *o*-фталевого диальдегіду згідно протоколу [153]. Зразки печінки гомогенізували у фосфатному буфері (0,01 М, рН 7,4) у співвідношенні 1 : 10 (w/v) з наступним осадженням протеїнів 6% HClO_4 (ТХО) у співвідношенні 1:7. Зразки центрифугували при 2200 об/хв при 4°C протягом 10 хв. До отриманих супернатантів додавали 0,1 М Na-фосфатний буфер, що містив 0,005 М ЕДТА та 1% *o*-фталевий диальдегід. Інкубацію проводили протягом 15 хв в темряві при кімнатній температурі, після чого проводили вимірювання інтенсивності флуоресценції при $\lambda_{\text{ex}}=360$ нм, $\lambda_{\text{em}}=420$ нм на флуориметрі FLx800 (Biotek, США). Як стандарт використовували відновлений глутатіон (Sigma, США).

Визначення вмісту продуктів, що реагують з ТБК. Вміст продуктів ПОЛ в печінці щурів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [154]. Для визначення продуктів реакції з ТБК в печінці, до 100 мкл гомогенату додавали 200 мкл 10%-го розчину охолодженої ТХО. Після 15-хв інкубації на холоді зразки центрифугували при 2200 g 15 хв при 4°C. До 200 мкл супернатанту додавали 200 мкл 0,67%-го розчину ТБК. Отримані зразки витримували 20 хв на киплячій водяній бані. Після охолодження проводили

вимірювання оптичної густини при 532 нм за допомогою автоматичного спектрофотометра μ Quant («Biotek», США). Вміст продуктів, що реагують з ТБК у пробах визначали за калібрувальною кривою, яку будували з використанням стандарту тетраетоксипропану.

Визначення вмісту глюкози в крові тварин. Визначали напівавтоматичним приладом для вимірювання вмісту глюкози в крові «Глюкофот-Плюс» (Україна). Вимірювання проводили у всіх тварин на початку досліду та після введення стрептозотоцину перед поділом на групи.

Визначення загального вмісту протеїну. Вміст протеїну в тканинних зразках оцінювали двома методами: 1) за Лоурі (модифікація Петерсона) [155]. Вихідні розчини: 1. СТС: 0,1 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ і 0,2 % Na_2K виннокислий змішували з 20 % Na_2CO_3 . Реактив зберігається при кімнатній температурі 2 місяці. 2. 10 % додецилсульфат натрію (SDS). 3. 0,8 н NaOH . 4. 2 н реактив Фоліна. 5. Розчин бичачого сироваткового альбуміну для побудови калібрувальної кривої. Реактив А: змішували СТС: 0,8Н NaOH : 10 % $\text{SDS}:\text{H}_2\text{O}$ у співвідношенні 1:1:1:1. Реактив В: реактив Фоліна розводили H_2O у співвідношенні 1:2. Зразки розводили фосфатним буфером у 1000 разів. До 100 мкл зразку додавали 100 мкл реактиву А, перемішували та інкубували 10 хв при кімнатній температурі. Після цього додавали 50 мкл реактиву В, перемішували і через 30 хв вимірювали оптичну густину при 750 нм. 2) за методом Бредфорд [156]. Концентрацію протеїну перераховували за калібрувальною кривою з бичим сироватковим альбуміном як стандартом.

Визначення активності лізілоксидази (ЛО). Ензиматичну активність ЛО визначали в екстрактах зразків серцевої аорти, легені та печінки тварин. Для приготування екстрактів з аорти, очищені від серцевого м'язу зразки судини розтирали в рідкому азоті, додавали 0,12 М $\text{NaCl}/0,016$ М К-фосфатний буфер (рН 7,7) із розрахунку 2,5 мл/г тканини. Гомогенат центрифугували при 15000 об/хв протягом 30 хв. Отриманий осад промивали 0,016 М К-фосфатним буфером рН 7,7, потім двічі екстрагували розчином

4М сечовини в цьому ж самому буфері протягом 18 год. Активність ЛО в екстрактах легені та печінки визначали за утворенням флуоресцентного продукту реакції H_2O_2 з фолієвою кислотою на мікропланшетному рідері Flx800 (США) [157]. Екстракти з тканин легені та печінки готували наступним чином: Зразки тканин розтирали в рідкому азоті й екстрагували 0,1 М Na-боратним буфером рН 10,5 з 1,2 М сечовиною й піддавали озвучуванню протягом 30 сек. Для подальших досліджень використовували супернатанти отриманих екстрактів після їх центрифугування (10 хв при 12000 g.).

Визначення активностей семікарбазидчутливої амінооксидази (САО), діамінооксидази (ДАО) та поліамінооксидази (ПАО). Активності амінооксидаз визначали в цитозольній та мікросомній фракціях нирки та легені за допомогою флуориметричного методу [158]. Отримані зразки (~1 мг протеїну) попередньо інкубували протягом 20 хв з наборами специфічних інгібіторів до інших амінооксидаз, для виключення їх конкуренції за субстрат. Як субстрати використовували: 10 мМ метиламін для САО, 2 мМ путресцин для ДАО і 2,5 мМ спермідин для ПАО.

Визначення активності ксантинооксидази (КО) в плазмі крові. Визначення активності КО проводили в 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 7,8, який містив 0,3 мМ ЕДТА та 0,25 мМ ксантин. Активність ензиму визначали за початковою швидкістю утворення сечової кислоти ($\text{tg}\alpha$) при довжині хвилі 295 нм, або за коефіцієнтом молярної екстинкції [159].

Визначення активності глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази (АДГЗ). Активність АДГЗ визначали в печінці, нирці та мозку щурів спектрофотометрично при 340 нм на СФ-46 за швидкістю відновлення НАД в НАДН при 25°C [160]. Після декапітації щурів тканини швидко промивали в льодяному 0,1М К-фосфатному буфері, рН 8,0, гомогенізували в 50 мМ К-фосфатному буфері, рН 8,0 (1:4). Гомогенат центрифугували при 12000 об/хв протягом 30 хв. Надосадову

рідину (що містила мікросоми та цитозоль) центрифугували при 105000 g протягом 90 хв. Мікросоми відокремлювали, а цитозоль використовували для визначення активності АДГ1 та АДГ3. Всі операції проводили при +2-4°C. Для дослідження активності АДГ3 визначали оптимальні концентрації НАД, формальдегіду (ФА) та відновленого глутатіону, а також концентрації протеїну цитозолу, за яких швидкість реакції була пропорційна кількості доданого протеїну, тобто за умов прямолінійної залежності утворення НАДН від кількості ензиму та при наявності субстратів в нелімітуючих концентраціях. Реакційна суміш (3 мл) містила наступні кількості компонентів з розрахунку на 1 мл: 1 мкмоль НАД, 1,5 мкмоль глутатіону, 2 мкмоль формальдегіду (в окремих випадках від 2 до 8 мкмоль) в 50 мМ К-фосфатному буфері, рН, 8,0, а також цитозоль (1 мг протеїну в пробі). Контрольна проба містила всі компоненти, крім формальдегіду (в окремих випадках крім глутатіону). Реакцію ініціювали внесенням ензиму (цитозолу), який додавали в мінімальному об'ємі при швидкому помішуванні реакційної суміші. Одночасно фіксували початок реакції. Активність АДГ3 виражали в нмоль НАДН/хв/мг протеїну.

2.5 Імуноензимний аналіз карбонільних груп в протеїнах

Вміст карбонільних груп в протеїнах визначали з використанням комерційного набору ELISA (Sigma, США) [161]. Метод базується на якісній реакції 2,4-ДНФГ із $=C=O$ групами протеїнів, внаслідок якої він перетворюється на 2,4-динітрофенілгідразон. Для визначення даного показника використовували специфічні антитіла Rabbit Anti-DNP Antibody («Sigma», США) у твердофазному імуноензимному аналізі за стандартною методикою. Для цього в лунки 96-лункових планшетів («Nunc», Данія) вносили по 0,11 мл розчинів антигенів в концентрації 10 мкг/мл в 0,02 М бікарбонатному буфері рН 9,5. Адсорбцію протеїнів проводили протягом 18 год при температурі +4°C. Після цього лунки тричі відмивали 0,01 М К-фосфатним буфером (рН 7,4); 0,14 М NaCl; 0,05% Tween-20 (ТФБ) і вносили

до них по 0,1 мл розчину ТФБ з 5% сухого знежиреного молока для блокування вільних центрів зв'язування протеїнів. Блокування проводили протягом 18 год при температурі +4°C. Після цього лунки тричі відмивали 0,01М К-фосфатним буфером (рН 7,4), що містив 0,14 М NaCl; 0,05% Tween-20 (ТФБ). Потім в лунки вносили по 0,1 мл кон'югату Goat Anti-Rabbit IgG з пероксидазою хрону («Sigma», США), розведеними в ТФБ 1:2000 проти вихідного. Інкубували при температурі +37°C протягом 1 год, після чого тричі відмивали ТФБ. На наступному етапі в лунки вносили по 0,1 мл кон'югату пероксидази хрону (Goat Anti-Rabbit IgG–HRP Conjugate, «Sigma», США), розведеного в ТФБ 1:800 проти вихідного. Інкубували при температурі +37°C протягом 1 год, тоді тричі відмивали ТФБ та вносили до лунок по 0,1 мл 0,05М калій-фосфатного буферу (рН 6,0) з 0,03% H₂O₂ та 0,04% *o*-фенілендіаміну («Синбіас», Україна). Реакцію зупиняли після появи забарвлення додаванням 50 мкл 2 М H₂SO₄. Оптичну густину визначали при 490 нм за допомогою автоматичного мікроспектрофотометру μ Quant («Biotek», США).

2.6 Отримання спектрів електронного парамагнітного резонансу (ЕПР).

Для аналізу спектрів ЕПР зразки крові та печінки заморожували в прес-формі та зберігали при температурі рідкого азоту. Спектри ЕПР реєстрували на радіоспектрометрі «Varian E-109» (США) при температурі рідкого азоту.

Параметри запису спектрів зразків тканини печінки були наступними [162]:

- діапазон зміни магнітного поля - (2750 – 3750) Gs,
- амплітуда модулювання магнітного поля – 8 Gs (2 Gs для вільних радикалів);
- частота модулювання магнітного поля – 100 кГц;
- потужність НВЧ коливань – 5 мВт (0,2 мВт для вільних радикалів);

- частота НВЧ коливань – (9,6 – 9,9) ГГц.

При реєстрації спектрів ЕПР зразків крові:

- діапазон зміни магнітного поля - (0 – 4000) Gs,
- амплітуда модулювання магнітного поля – 8 Gs (2 Gs для вільних радикалів);
- частота модулювання магнітного поля – 100 кГц;
- потужність НВЧ коливань – 5 мВт (0,2 мВт для вільних радикалів);
- частота НВЧ коливань – (9,6 – 9,9) ГГц

В спектрі тканини печінки, приклад якого показано на Рис. 2.1, визначали розмах сигналів:

$g=2.25$ - цитохром P-450 з ферумом гему в низькоспіновій окисленій формі;

$g=2.14$ - протеїни ендоплазматичного ретикулума, що містять Mn^{2+} ;

$g=2.05$ – протеїни, що містять Cu^{2+} : супероксиддисмутаза, цитохромоксидаза;

$g=2.00$ - мітохондрійні убіхінони та флавопротеїни у вільнорадикальній формі;

$g=1.97$ - мітохондрійний ензим сульфітоксидаза у відновленому стані з атомом Mo^{7+} в активному центрі, ксантинооксидаза;

$g=1.94$ – ферум-сірчані протеїни мітохондрійних дихальних ланцюгів з негемовим ферумом у відновленому стані;

В спектрі ЕПР крові визначали:

$g=6.0$ - метгемоглобін з гемовим ферумом у окисленій високоспіновій формі.

$g=4.2$ – трансферин, за вмістом Fe^{3+} ;

$g=2.05$ – церулоплазмін, за вмістом Cu^{2+} ;

$g=2.0$ – вільні радикали з часом життя більше ніж 10^{-7} с.

Для кількісної оцінки сигналів ЕПР використовували метод подвійного інтегрування з використанням комп'ютерної програми спектрального аналізу Multicon, розроблену в Інституті напівпровідників НАНУ.

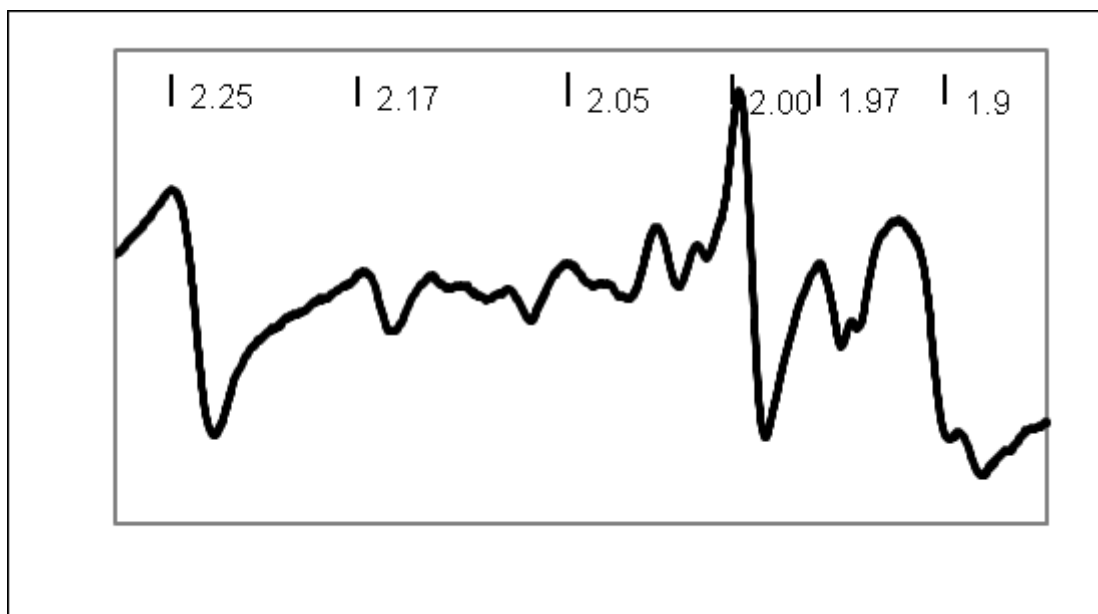


Рис. 2.1. Спектр ЕПР тканини печінки щурів. Інтенсивність сигналів визначається як відстань (різниця у значеннях вихідного сигналу з детектора радіоспектрометра) між максимальним та мінімальним значенням першої похідної поглинання НВЧ енергії у відповідному діапазоні g -фактору (при постійній частоті НВЧ генератора, в діапазоні змін напруження магнітного поля).

2.7 Імуноензимний аналіз маркера постсинтетичних модифікацій протеїнів – карбоксиметиллізину

На моделі СТЦД визначали вміст N(6)-карбоксиметиллізину (КМЛ) у сироватці крові з використанням комерційного набору (Shanghai BlueGene Biotech CO., LTD, China), в якому для кількісного визначення КМЛ використовується «sandwich»-імуноензимний аналіз. Згідно протоколу виробника, в лунки 96-лункового планшету з попередньо сорбованими антитілами, специфічними до КМЛ, вносили стандарти та зразки. Зразки піпетували для забезпечення ефективного зв'язування КМЛ у складі протеїнів з іммобілізованим антитілом. Після видалення будь-яких

незв'язаних речовин до лунок додавали анти- КМЛ антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP). Після промивання для видалення будь-якого незв'язаного антитіло-ензимного реагенту в лунки додавали субстратний розчин. Колір розвивався пропорційно кількості КМЛ, зв'язаного на початковій стадії. Розвиток барвлення зупиняли “stop”-реагентом. Оптичну густину вимірювали при 450 нм за допомогою автоматичного мікроспектрофотометра μ Quant («Biotek», США).

2.8 Електрофоретичне дослідження модифікації структури протеїнів

Електрофоретичне розділення протеїнів проводили в ПААГ за методом Леммлі [163]. При товщині блоку поліакриламідного гелю 6 мм електрофорез проводили протягом 4 год при напрузі 100 В і силі струму 25-30 мА. Після завершення електрофоретичного розділення гель переносили у 0,5% розчин амідового чорного в суміші оцтова кислота-метанол-дистильована вода (1:5:5). Після 30 хв фарбування гель декілька хвилин промивали проточною водою, а потім 10% оцтовою кислотою до повного знебарвлення ділянок, які не містять протеїну.

2.9 Флуоресцентна спектроскопія

Спектрофлуориметричний аналіз зразків альбуміну сироватки людини (ЛСА) та лізину проводили на флуориметрі «SIGNE-4M». З цією метою реєстрували спектри емісії флуоресценції лізину при довжині хвилі збудження $\lambda_{ex}=340$ нм, а також спектри збудження та емісії флуоресценції ЛСА при $\lambda_{em}=460$ нм та $\lambda_{ex}=350$ нм, відповідно.

Значення інтенсивності флуоресценції аддуктів глікування ЛСА та желатини після інкубування з різними альдегідами та їх комбінаціями визначали на мікропланшетному рідері FLx800 (“BioTek” США) за різних довжин хвиль збудження і емісії флуоресценції: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/420$ (нм), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/460$ (нм) та $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=360/485$ (нм).

2.10 Рентгенологічне дослідження тварин

Отримання зображення засноване на послабленні рентгенівського випромінювання при його проходженні через різні тканини з подальшою реєстрацією його на рентгеночутливу плівку. В результаті, на плівці виходить сумоване зображення всіх тканин (тінь). Тобто, для отримання адекватного рентгенівського знімку необхідно проводити дослідження рентгенологічно неоднорідних утворень [164]. При діагностичній рентгенографії доцільно робити знімки не менше, ніж у двох проекціях. Це пов'язано з тим, що рентгенограма є пласким зображенням трьохвимірного об'єкту, тобто локалізацію патологічного осередка можна виявити тільки за допомогою двох проекцій.

2.11 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Виділення РНК. Виділення РНК проводили за методом Хомчинського з Trizol-реагентом, що містить гуанідинтіоціанат та кислий фенол [165]. В пробірку об'ємом 1,5 мл вносили дослідну пробу, додавали Trizol-реагент та інтенсивно перемішували вміст пробірки до появи гомогенної емульсії, проби переносили на лід на 5 хв. Потім до отриманої емульсії додавали 200 мкл хлороформу та інтенсивно перемішували. Пробірку з сумішшю витримували на холоді 5 хв, після чого центрифугували 5 хв при 14000 об/хв для розмежування фаз. Прозору верхню фазу з РНК (~300 мкл) обережно переносили, не допускаючи змішування, в чисту пробірку об'ємом 1,5 мл. До препарату додавали рівний об'єм ізопропанолу, інтенсивно перемішували, поміщали на -20°C на 30 хв та центрифугували 15 хв при 14000 об/хв. Супернатант повністю видаляли перевертанням пробірки для запобігання ризику втрати осаду РНК. До осаду додавали 1 мл холодного 75% етилового спирту, перемішували вміст 4-5-разовим струшуванням, центрифугувати 5 хв при 14000 об/хв і обережно видаляли супернатант перевертанням пробірки (3 рази). Осад висушували при температурі 65°C протягом 3 хв. В пробірку додавали 50-100 мкл бідистильованої H_2O . Вміст пробірки суспендували на

вортексі 15-20 с і залишали при кімнатній температурі на 15-20 хв. Вміст пробірки повторно суспендували на вортексі. Концентрацію РНК вимірювали за поглинанням при 260 нм за допомогою спектрофотометра DeNovix (DeNovix Inc., США). Якість отриманої РНК оцінювали за ступенем деградації смуг рибосомних РНК після електрофоретичного розділення в агарозному гелі, а також за поглинанням при 260/230 нм і 260/280 нм. (Виділену РНК зберігали при температурі -70°C або негайно використовували для аналізу).

Зворотна транскрипція. Для синтезу кДНК використовували комерційний набір RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила наступні компоненти: РНК – 1-5 мкг, 5x буфер – 4 мкл, суміш 10 мМ dNTP – 2 мкл, Oligo-dT праймер – 1 мкл, інгібітор РНКаз Ribolock 20 U/мкл – 1 мкл, зворотна транскриптаза 200 U/мкл – 1 мкл.

Синтез кДНК проводили за наступних умов: 42°C – 60 хв, 95°C – 5 хв, за допомогою приладу Т-Су (Creason Technologies, Нідерланди).

Кількісна ПЛР. Для ПЛР в реальному часі використовували комерційний набір Luminaris Color HiGreen High ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США) і ампліфікатор QTower 2.2 Real-Time PCR (Analytik Jena, Німеччина). Реакційна суміш для кількісної ПЛР об'ємом 20 мкл містила наступні компоненти: кДНК – 2 мкл, 2x Master Mix – 4 мкл, прямий праймер 10 мкМ – 1 мкл, зворотний праймер 10 мкМ – 1 мкл, MilliQ H_2O – 12 мкл. Ампліфікацію проводили в наступному температурному режимі протягом 25-40 циклів.:

- Початкова денатурація - 95°C , 10 хв.
- Ампліфікація (40 циклів):
 - o Денатурація – 95°C , 15 сек.
 - o Гібридизація - 60°C , 30 сек.
 - o Подовження - 72°C , 30 сек.
- Плавлення – $60-90^{\circ}\text{C}$.

Дані опрацьовували в програмі qPCRsoft 3.1 та Excell.

2.12 Статистична обробка результатів

Опрацювання і статистичну обробку результатів проводили із використанням Microsoft Excel 2003. Всі результати представлені у вигляді середнього значення (M) та стандартної похибки (m). Попарні порівняння здійснювали за допомогою двовибіркового t-тесту Ст'юдента для незалежних вибірок з нерівними дисперсіями [166]. Вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ III

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Дія екзогенних альдегідів та їх комплексів на модифікацію лізину, альбуміну сироватки крові людини та пептидів колагенової природи в дослідах *in vitro*

3.1.1 Порівняльна характеристика альдегідів за здатністю модифікувати лізин

Реактивні карбонільні сполуки здатні неензиматично реагувати з SH- і NH₂-групами протеїнів і нуклеїнових кислот. У процесі формування альдегід-залежних модифікацій активну участь беруть ε-NH₂-групи L-лізину [74]. Для якісної оцінки змін, які відбуваються в процесі глікування L-лізину *in vitro*, вимірювали спектри флуоресценції після інкубації з глікувальними агентами протягом різних проміжків часу та без ефекторів (контроль). Було проведено порівняльне дослідження накопичення продуктів, що флуоресціюють за інкубації L-лізину з різними альдегідами та їх комбінаціями [167]. Із представлених на рис. 3.1 (А, Б) спектрів видно, що дані агенти глікування мають різну реакційну здатність по відношенню до L-лізину, що призводить до різного ступеня накопичення хромофоровмісних продуктів.

Також варто відмітити, що максимуми спектрів флуоресценції (збудження $\lambda_{ex}=350$ нм) продуктів взаємодії L-лізину з альдегідами, що утворюються ендогенно, в порівнянні зі спектрами флуоресценції L-лізину без агентів зазнають зсуву в більш довгохвильову область. Інтенсивність флуоресценції (ІФЛ) в пробах по відношенню до контролю збільшувалась: L-лізину з рибозою (РБ) – в 2,9 разів ($\lambda_{max}=410$ нм); L-лізину з гліоксалем (ГЛ) – в 2,7 ($\lambda_{max}=410$ нм); L – лізину з (РБ+ГЛ) – в 5 раз ($\lambda_{max}=420$ нм); L – лізину з формальдегідом (ФА) – в 1,2 ($\lambda_{max}=440$ нм); L-лізину з (РБ+ФА) – в 16,5 ($\lambda_{max}=400$ нм); L – лізину з (РБ+ГЛ+ФА) – в 8 ($\lambda_{max}=410$ нм); L-лізину з (ГЛ+ФА) – в 10 разів ($\lambda_{max}=400$ нм).

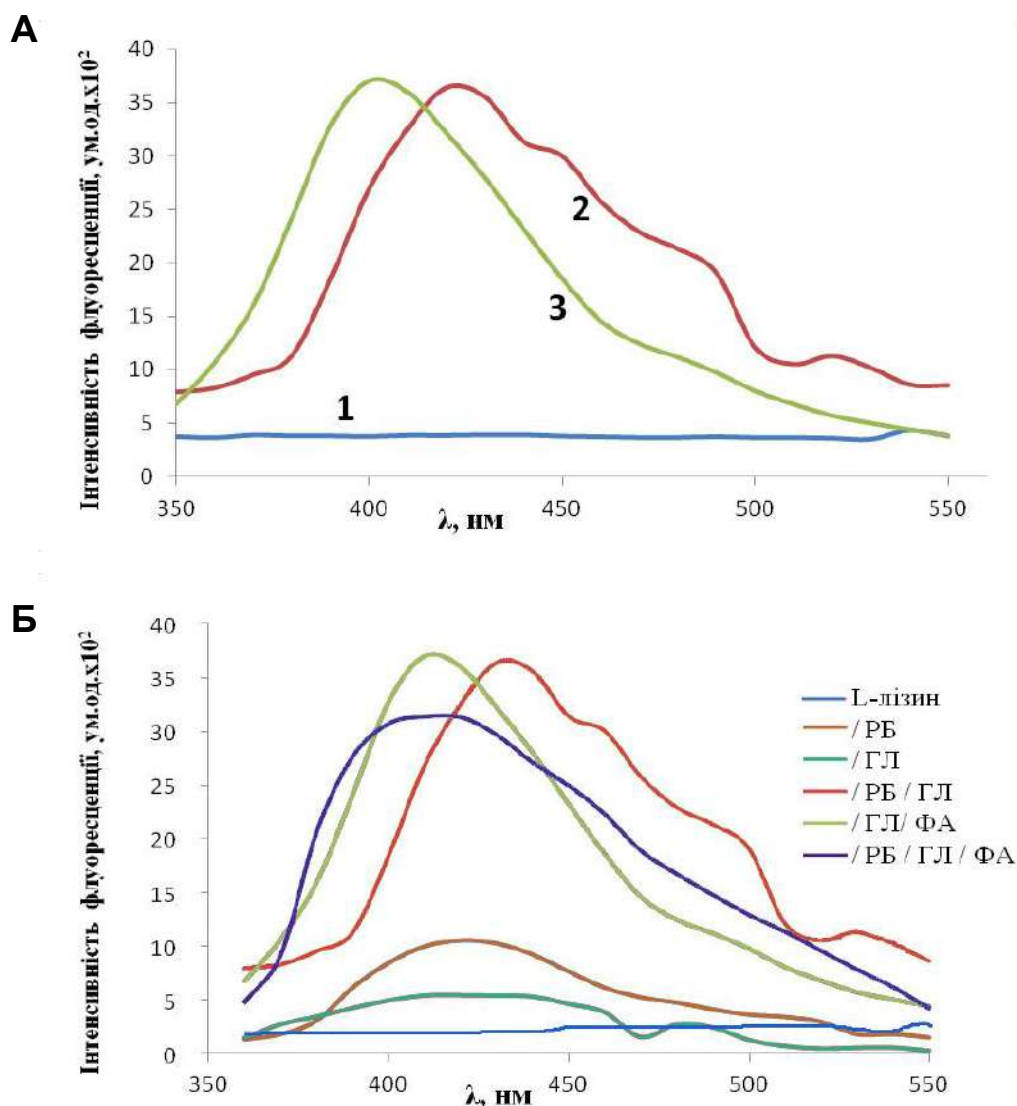


Рис. 3.1. А. Спектри емісії флуоресценції ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ нм) L-лізину (1) та продуктів взаємодії L-лізину з РБ та ГЛ (2); L-лізину з ГЛ+ФА (3); інкубація 1 місяць. **Б.** Спектри емісії флуоресценції ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ нм) продуктів взаємодії L-лізину з РБ; L-лізину з ГЛ; L-лізину з ГЛ+РБ; L-лізину з ГЛ+ФА; L-лізину з РБ+ГЛ+ФА; інкубація, 1 місяць

Утворення флуоресцентних аддуктів також аналізували за зміною інтенсивності флуоресценції в динаміці, як показано на рис. 3.2, на прикладі взаємодії L - лізину (20 мМ) з рибозою (20 мМ) у часі ($\lambda_{\text{ex}}=360/\lambda_{\text{em}}=420$). Було показано, що за взаємодії L-лізину з різними альдегідами утворюються флуоресцентні аддукти, які мають різні флуоресцентні властивості. Також

було відмічено, що з часом відбувається збільшення накопичення флуоресцентних аддуктів в ізольованому дослідному середовищі.

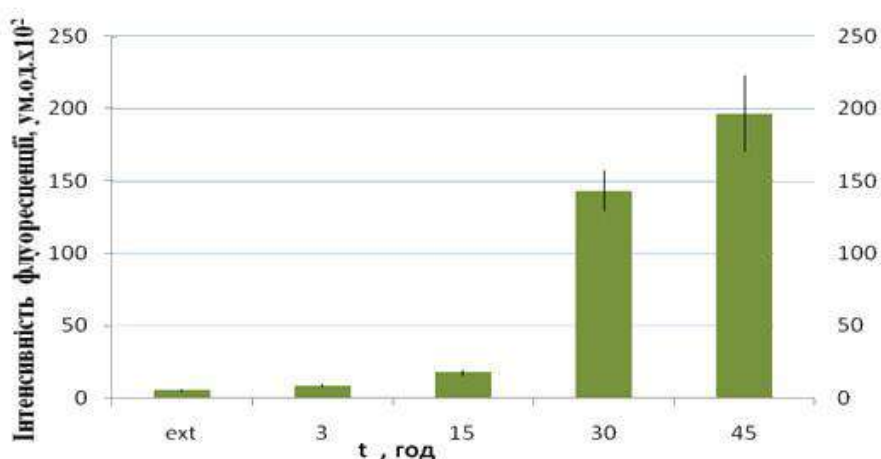


Рис. 3.2. Рибоза утворює з L-лізином аддукти, що відрізняються за динамікою змін інтенсивності флуоресценції у часі ($\lambda_{\text{ex}}=360\text{нм}/\lambda_{\text{em}}=420\text{ нм}$).

3.1.2 Порівняльна характеристика альдегідів за здатністю модифікувати залишки лізину у складі альбуміну сироватки людини

У досліджах *in vitro* проведено порівняльне дослідження модифікувальної дії на ЛСА ендогенних альдегідів. Після інкубування розчину ЛСА (20 мМ) з альдегідами: РБ, ГЛ, МГЛ та ФА (20 мМ кожний) та за їх комбінування в 0,1 М Na-фосфатному буфері (рН 7,4), що містив 0,02% азиду натрію, при 37 °С у темряві протягом 30 діб, визначали флуоресцентні властивості аддуктів, вміст протеїнових карбонільних груп, перерозподіл молекулярної маси протеїну. Флуоресценцію біологічних зразків ($\lambda_{\text{ex}}=(300\text{--}420)\text{нм}/\lambda_{\text{em}}=(420\text{--}600)\text{нм}$) використовували як прогностичний маркер рівня КПП-модифікованих протеїнів [168]. У цьому дослідженні *in vitro* під час взаємодії альдегідів з альбуміном відбувається модифікація останнього, що істотно змінює його флуоресцентні властивості. Відбувається посилення інтенсивності «блакитної» флуоресценції ($\lambda_{\text{ex}}=360\text{ нм}/\lambda_{\text{em}}=420\text{ нм}$), що є свідченням стимульованого альдегідами утворення протеїнових аддуктів. Аналіз наведених на рис. 3.3, А спектрів збудження флуоресценції за дії альдегідів вказує на відмінність у хімічній структурі утворених аддуктів, про

що свідчать різні спектральні характеристики флуоресценції: максимум довжини хвилі та форма спектрів (напівширина, наявність тонкої структури). Ці зміни свідчать про те, що під час комбінування різних альдегідів, можливо, утворюються нові за хімічною будовою аддукти, які відрізняються від таких, що формуються за впливу кожного з ефекторів окремо. На рис. 3.3, Б наведено спектри збудження флуоресценції ($\lambda_{\text{см}}=460$ нм) зразків ЛСА під час інкубації з ФА протягом 5, 10 та 15 діб. Як видно, з часом відбувається перерозподіл спектральної густини між максимумом збудження альбуміну (280 нм) та формальдегід-індукованого аддукту (340 нм).

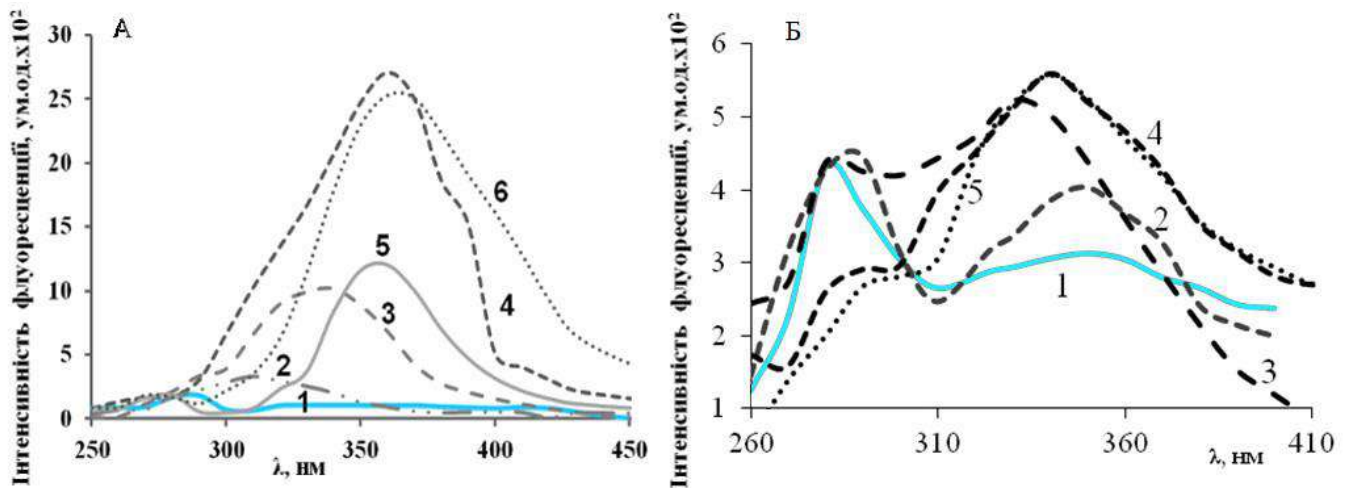


Рис. 3.3. А – спектри збудження флуоресценції зразків ЛСА через 5 діб інкубації без світла при 37 °С, рН 7,4: 1 – без альдегідів; з альдегідами: 2 – ФА, 3 – РБ, 4 – МГ, 5 – (РБ+ФА), 6 – (РБ+МГ+ФА); Б– спектри збудження флуоресценції зразків АСЛ за інкубації без/з ФА: 1 – без ФА, 2-5 – з ФА (2- без інкубації, 3 – інкубація 5 діб , 4 – інкубація 10 діб, 5 – інкубація 15 діб).

Для оцінки характеру комбінованої модифікуючої дії альдегідів інтенсивність флуоресценції альбуміну із сумішшю альдегідів порівняли з математичною сумою цього показника за окремої дії цих альдегідів. Результати наведено в Табл. 3.1. У більшості представлених результатів інтенсивність флуоресценції альбуміну за комбінування альдегідів є вищою

за розраховану суму, що свідчить про посилення постсинтетичних протеїнових модифікацій з утворенням флуоресцентних аддуктів за одночасного посилення утворення різних альдегідів. Лише у разі дії рибози з метилглюксалем, а також рибози із глюксалем, результати виявилися нижчими, ніж очікувалося. Так, у разі дії рибози із глюксалем інтенсивність флуоресценції знижується у 6 разів, що, можливо, пов'язано з посиленням утворення аддуктів, що не мають флуоресцентних властивостей. Відомо, що альдегідстимульовані модифікації протеїнів залежно від їх хімічної будови або мають флуоресцентні властивості, або є нефлуоресцентними.

Таблиця 3.1

Інтенсивність флуоресценції зразків альбуміну сироватки людини ($\lambda_{\text{зб}} = 360$ нм, $\lambda_{\text{ем}} = 420$ нм, відн. од.) за окремої інкубації альдегідів і за їх комбінування ($n = 3$)

Альдегіди	Розрахункова сума за дії окремих альдегідів			Комбінована дія($n=3$)		
	10 діб	20 діб	30 діб	10 діб	20 діб	30 діб
РБ + МГ	586±14	584±4	569±16	386±3*	412±17*	348±16*
ФА + РБ	344±19	459±8	525±11	491±23*	590±9*	622±4*
ФА + РБ + МГ	622±24	632±2	630±9	765±8*	769±23*	719±14*
ФА + МГ	315±19	220±8	167±14	585±40*	530±43*	430±23*
ГЛ + РБ	706±23	925±6	973±3	142±14*	156±6*	157±8*
ГЛ + ФА	435±34	561±13	570±5	690±9*	764±25*	742±26*
ГЛ + РБ + ФА	745±33	973±9	1034±7	685±23*	719±24*	592±41*

* $P < 0,05$ відносно розрахованої суми

Такі аддукти як пентозидин, крослін, піропіридин, ГОЛД, МОЛД мають «блакитну» флуоресценцію на відміну від карбоксиметил-, карбоксиетиллізину, піроліну, імідазолонів [169]. Тому можна припустити, що зменшення інтенсивності флуоресценції утворених аддуктів неоднозначно свідчить про зниження їх вмісту. Вважається, що карбонільні групи протеїнів утворюються внаслідок їх окиснювальної модифікації, зокрема, за дії гідроксильних радикалів. Однак експериментально доведено можливість формування протеїнових СО-груп неоксидативним шляхом під впливом альдегідів за умов *in vitro* [168]. Згідно з результатами нашої роботи в процесі модифікації ЛСА альдегідами в ізольованому модельному середовищі відбувається утворення протеїнових карбонільних груп (Рис.3.4). Збільшення їх вмісту в розчині ЛСА через один місяць інкубації з

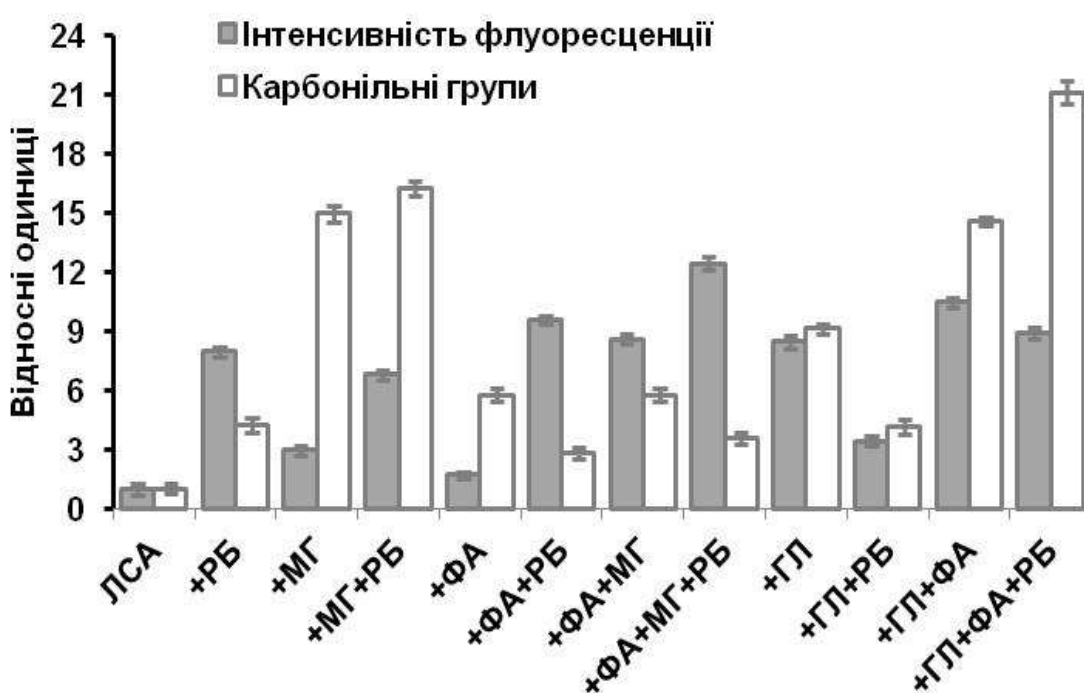


Рис. 3.4. Утворення флуоресцентних аддуктів та карбонільних груп у зразках ЛСА має різноспрямований характер і залежить від часу дії альдегідів та їх хімічної природи. Середні значення інтенсивності флуоресценції ($\lambda_{ex}=360$ нм, $\lambda_{em}=420$ нм) та вміст карбонільних груп у зразках ЛСА після інкубації в темряві при 37°C , з альдегідами ($n=3$) через 30 діб.

альдегідами становило: РБ – $(2,9 \pm 0,2)$ нмоль/мг протеїну; ФА – $(4,2 \pm 0,4)$ нмоль/мг протеїну; ГЛ – $(6,4 \pm 0,8)$ нмоль/мг протеїну, МГ – $(10,4 \pm 0,7)$ нмоль/мг протеїну. Одержані дані вказують на те, що у разі комбінованої дії альдегідів із додаванням ФА відбувається істотне зниження інтенсивності цього процесу. Зміни флуоресцентних властивостей пояснюються можливим утворенням нефлуоресцентних аддуктів. Водночас, результати відносно карбонілювання альбуміну явно свідчать про наявність певної конкуренції між окремими альдегідами. Також можливо, що у разі додаткової дії ФА прискорюються процеси подальшої модифікації карбонільних груп протеїну з утворенням міжмолекулярних зшивок. Таким чином, ФА за комбінованої дії з іншими альдегідами інтенсифікує утворення флуоресцентних аддуктів, але в той самий час істотно зменшує кінцевий вміст альдегідостимульованих протеїнових СО-груп. Одержані рейтинги альдегідів від найнижчої до найбільшої здатності формувати з альбуміном флуоресцентні аддукти ФА < МГЛ < РБ < ГЛ; карбонілювати протеїни: РБ < ФА < ГЛ < МГЛ; утворювати міжмолекулярні зв'язки: РБ < МГЛ < ГЛ < ФА, показують що досліджені альдегіди відрізняються за спрямуванням утворення специфічних протеїнових модифікацій.

Такий характер змін, на нашу думку, характеризує поступову модифікацію утворених флуоресцентних аддуктів (ФЛА) до таких, що є нефлуоресцентними. Швидкість та спрямованість зміни характеристик флуоресценції альбуміну за дії різних альдегідів також відрізнялись (Рис. 3.5 А). На рис. 3.5 Б, як приклад, представлена залежність вмісту СО-груп альбуміну від часу інкубації останнього з РБ + МГЛ. З результатів видно, що для дії цих альдегідів характерна різна динамія процесу карбонілювання. Тому виникає питання, чи дійсно використання показників «блакитної» ФЛ у повній мірі характеризує постсинтетичні модифікації протеїнів, що

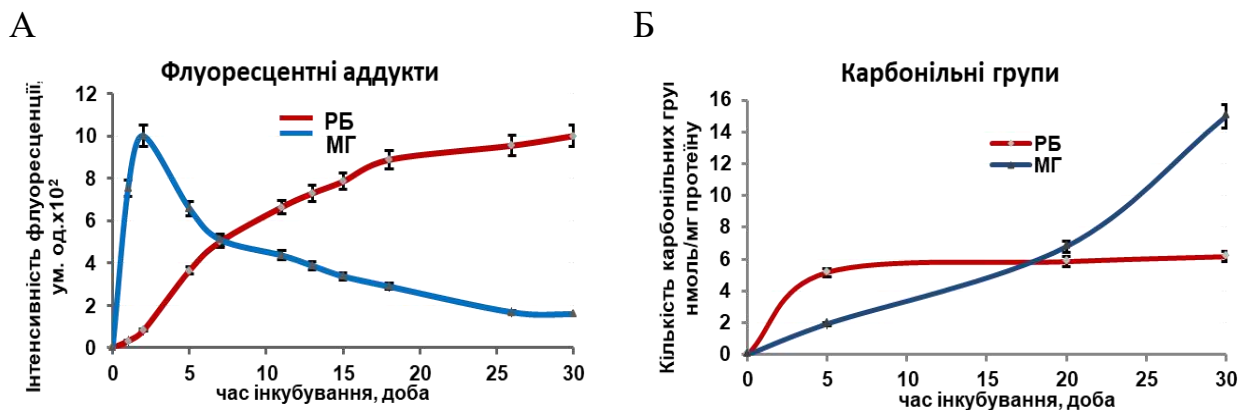


Рис. 3.5. Рибоза та метилглюксаль відрізняються за динамікою утворення флуоресцентних аддуктів з ЛСА та за накопиченням карбонільних груп у протеїні. Зміна в часі інтенсивності флуоресценції ($\lambda_{ex}=360$ нм, $\lambda_{em}=420$ нм) (А) та вмісту протеїнових карбонільних груп (Б) у зразках альбуміну людини після темної інкубації за температури 37°C, рН 7,4 з РБ та МГЛ (n=3).

спричинені дією РКС. На рис. 3.6 наведено електрофореграми, а на рис. 3.7 - денситограми альбуміну після інкубації без (А) та з ФА (Б). Молекулярна маса контрольного протеїну на 88% локалізована у діапазоні 60-70 кДа, але після інкубації протягом 25 діб без альдегідів цей показник зменшився до 75%. При додаванні до інкубаційного середовища альдегідів відбувається перерозподіл молекулярної маси у бік її збільшення шляхом утворення міжмолекулярних зшивок. Суттєво зростає густина розподілу у діапазонах 120-210 кДа та 210-340 кДа, що свідчить про формування високомолекулярних полімерів альбуміну. Шкала полімеризувальних властивостей альдегідів не співпадає з вищенаведеними по утворенню ФЛА та за ступенем карбонілювання протеїну. Так, наприклад, серед досліджених альдегідів, ФА у найменшій мірі формує флуоресцентні продукти та не вирізняється високою активністю по утворенню протеїнових СО-груп, однак, має найвищу полімеризувальну здатність.

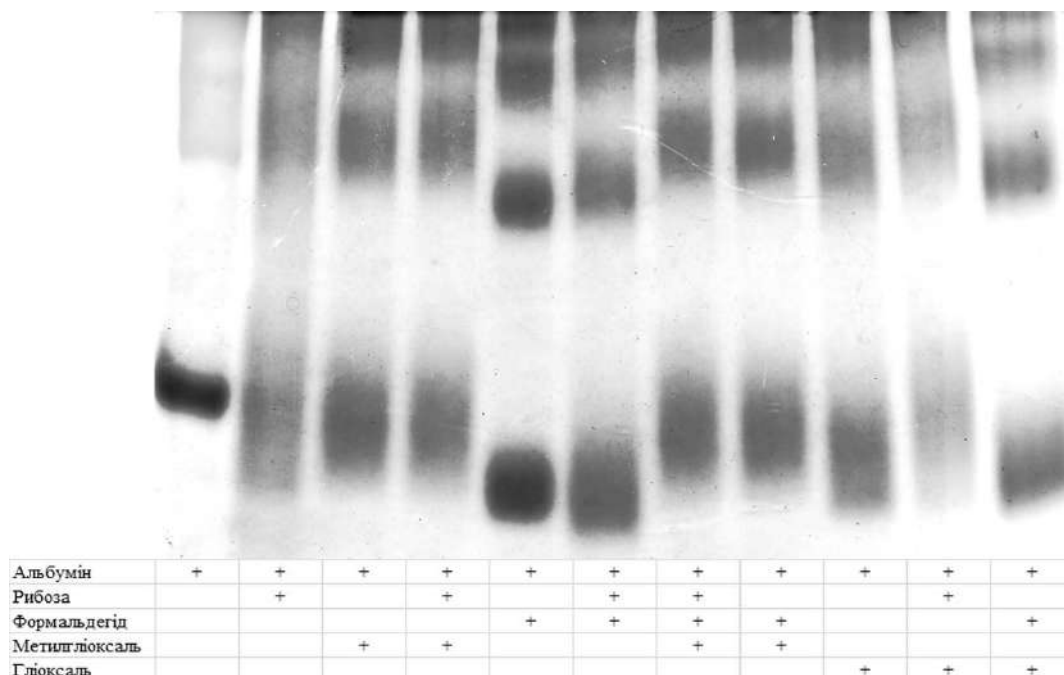


Рис. 3.6. Електрофореграма зразків ЛСА в ПААГ після темної інкубації при 37°C, рН 7,4 протягом 25 діб з альдегідами.

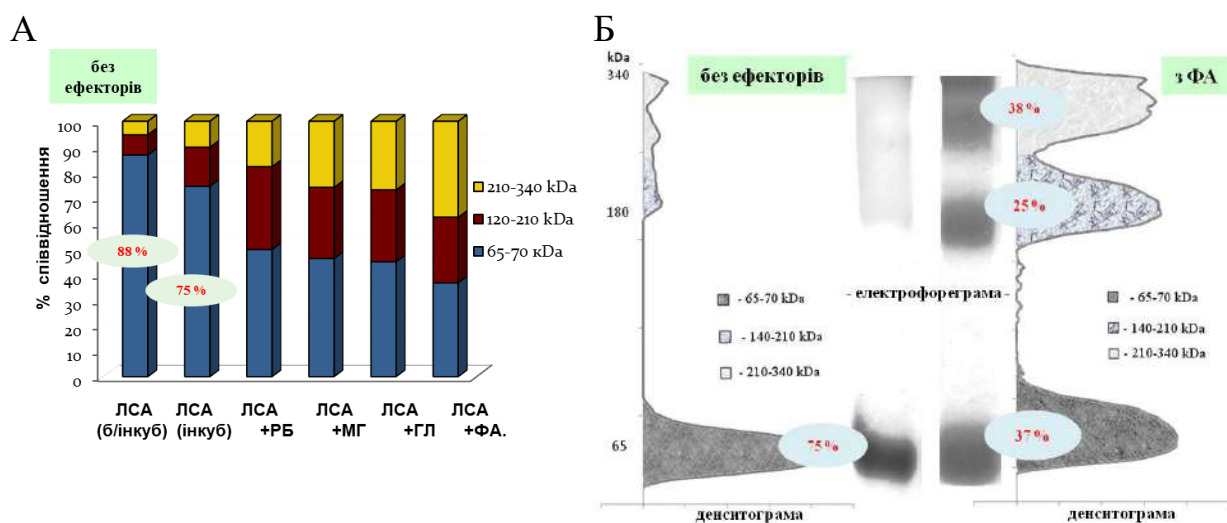


Рис. 3.7. Формальдегід характеризується найвищою здатністю до утворення міжмолекулярних зшивок у ЛСА. (А) Розподіл аддуктів ЛСА після інкубування з альдегідами в темряві протягом 25 днів при 37°C в Натрієво-фосфатному буфері рН 7,4; (Б) Електрофореграми та денситограми ЛСА після інкубування без або з ФА протягом 25 днів.

Таким чином, одержані рейтинги альдегідів від найнижчої до найбільшої здатності: формувати з альбуміном флуоресцентні аддукти – ФА<МГ<РБ<ГЛ; карбонілювати протеїни – РБ<ФА<ГЛ<МГ; утворювати міжмолекулярні зв'язки – РБ<МГ<ГЛ<ФА, – вказують на те, що альдегіди відрізняються за спрямуванням утворення специфічних протеїнових модифікацій. Вказані відмінності можуть свідчити про поступову модифікацію утворених ФЛА до таких, що є нефлуоресцентними.

3.1.3 Модифікація пептидів колагенової природи екзогенними альдегідами

В результаті аналізу взаємодії зразків желатини (ЖЛ) з альдегідами, які мають редукувальні властивості, було показано відмінність в їх дії та встановлено рейтинг їх модифікувальної активності за флуоресцентними та електрофоретичними характеристиками [170]. За інтенсивністю флуоресценції встановлено шкалу альдегідів: ФА<МГЛ<РБ<ГЛ. Результати електрофоретичного дослідження свідчать, що за дії альдегідів утворюються міжпептидні зшивки та перерозподіл у бік збільшення молекулярної маси фрагментів желатини. За цим показником встановлено такий рейтинг: РБ<ГЛ<ФА<МГЛ. У разі порівняння двох вищенаведених рейтингів видно, що вони не збігаються. Альдегіди, які мають найнижчу здатність формувати ФЛА, виявляють найвищу здатність утворювати міжмолекулярні зшивки в протеїнах. Для якісної оцінки змін, що відбуваються під час глікування пептидів ЖЛ, вимірювали спектри поглинання зразків. Отримані результати свідчать, що утворені ФЛА за взаємодії желатини з альдегідами різняться хімічною структурою, що описують різні максимуми довжини хвиль та форма спектрів ФЛ (наявність зміни тонкої структури, напівширина) (Рис. 3.8). $\lambda_{\text{ex max}}$ желатини становила без альдегідів 335 нм, тоді як при додаванні альдегідів: РБ – 360 нм, МГЛ - 413 нм, РБ + МГЛ – 420 нм; $\lambda_{\text{em max}}$ без альдегідів – 431 нм, при додаванні альдегідів: РБ – 435 нм, ГЛ - 469 нм, РБ +

МГЛ –476 нм. Показано, що РБ, ДР, ГЛ, АКР і ФА взаємодіють з розчинами желатини з утворенням ФЛА, рівень яких досягав максимальних значень на 30-у добу ($\lambda_{em}/\lambda_{ex}=360/420$ нм). У той же час для МГЛ найбільша інтенсивність ФЛА спостерігалась за 1-у добу, а на 30-ту добу знижувалась в 5 разів. Це може свідчити про утворення флуоресцентних аддуктів МГЛ з ЖЛ, які з часом переходять у нефлуоресцентну форму, що, в свою чергу, зумовлено особливістю структурних перетворень цього альдегіду.

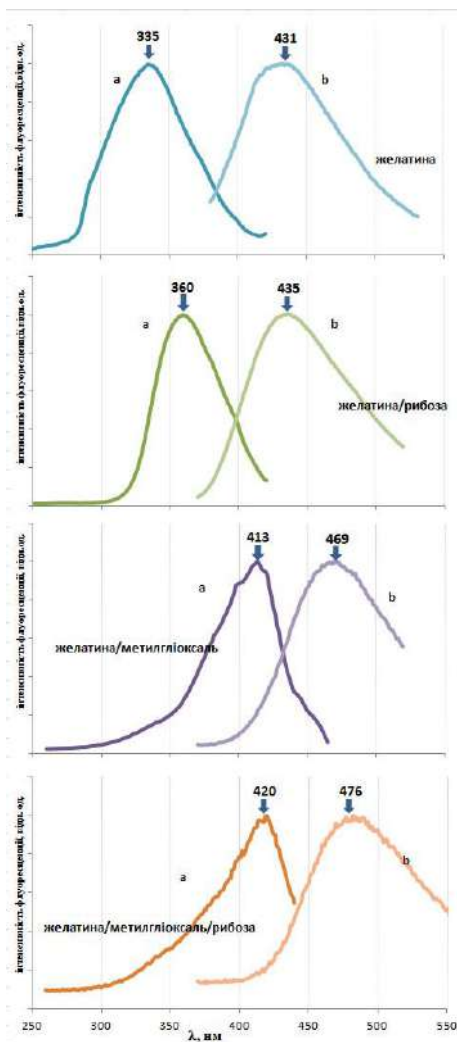


Рис. 3.8. Спектри збудження (а) та емісії (b) флуоресценції ($\lambda_{ex}=360$ нм, $\lambda_{em}=450$ нм) препаратів желатини за дії ефекторів через 30 діб інкубації без світла при 37°C, рН 7,4.

Результати досліджень показали, що РБ не впливає на утворення ФЛА ЖЛ з ГЛ та МГЛ, але проявляє слабку синергічну дію щодо ФА. Отже ФА суттєво знижує аддуктоутворювальні властивості цих альдегідів. Не дивлячись на те, що ФА має слабо виражену здатність до утворення ФЛА, йому притаманна активна полімеризувальна дія. На рис. 3.9 показано полімеризувальну дію альдегідів на фрагменти ЖЛ. Результати електрофорезу в ПААГ свідчать про перерозподіл молекулярної маси пептидів ЖЛ під впливом альдегідів, що проявляється у зниженні відсотку низькомолекулярних фрагментів ЖЛ. Результати дослідження свідчать, що використані в дослідах альдегіди відрізняються за спрямованістю утворення протеїнових модифікацій. Так, ФА має найнижчу здатність утворювати ФЛА, але при цьому володіє найвищою спроможністю формувати міжмолекулярні протеїнові зшивки.

Тому при гіперпродукуванні ФА флуоресценція поверхні шкіри або інших біологічних зразків не в повній мірі буде характеризувати інтенсивність постсинтетичних модифікацій протеїнів.

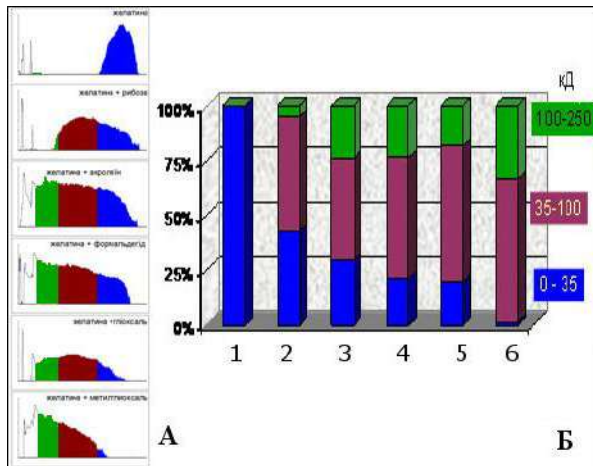


Рис. 3.9. Аналіз електрофоретичного розподілу желатини через 2 місяці: денситограма електрофореграми (А); розподіл за 3-ма зонами молекулярної маси (Б), 1 – ЖЛ без альдегідів; з альдегідами: 2 – РБ; 4 – ФА; 5 – ГЛ; 6 – МГЛ.

3.2 Розробка «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» для зменшення інтенсивності карбонільного стресу, та дослідження ефективності її застосування за умов *in vitro*

3.2.1 Приготування «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» та тестування ефективності її дії

Враховуючи, що альдегіди активно вступають в реакцію з відновленими тіолами (цистеїном, GSH) та аміногрупами протеїнів, нами було розроблено та застосовано препарат, який містить гліцин, лізин та N-АЦ, для нормалізації рівня ендогенних альдегідів та зменшення відповідних протеїнових модифікацій при гіперпродукуванні альдегідів за умов *in vitro*. Дослідним шляхом було визначено концентраційну залежність впливу препарату на вміст альдегідів. Зокрема, було проведено дослідження впливу препарату на зміну концентрації формальдегіду в гомогенаті печінки щура (Рис. 3.10). Проведені дослідження продемонстрували достовірну зміну концентрації ФА, що свідчить про зв'язування альдегіду запропонованим препаратом в гомогенаті печінки щура *in vitro*.

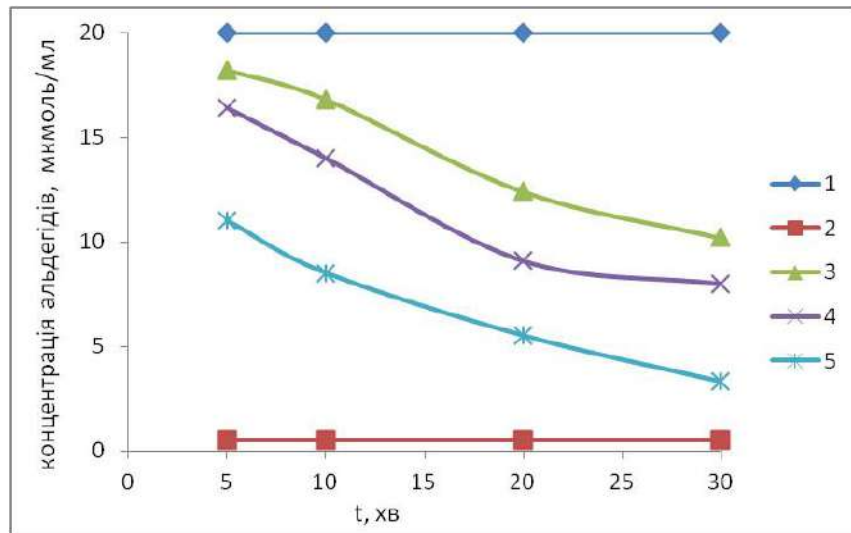


Рис. 3.10. Зміна концентрації ФА в гомогенаті печінки щура, в часі: 1- 20 мкМ ФА; 2- гомогенат без ефекторів; 3- гомогенат з 20 мкМ ФА; 4- гомогенат з 20 мкМ ФА +20 мкМ препарат; 5- гомогенат з 20 мкМ ФА+200 мкМ препарат.

3.3 Гліцерол-стимульований рабдоміоліз - модель гіперкарбонільного стану

3.3.1 Біохімічна характеристика розвитку рабдоміолізу

Після внутрішньом'язевого введення щурам розчину гліцеролу спостерігали зміни біохімічних показників, що характеризували розвиток РМ (Рис.3.11): підвищення вмісту гему та білірубину, а також появу лабільного феруму в плазмі крові, зі зміненою формою сигналу ЕПР, зростання ГО активності в тканині печінки.

На 4-ту добу розвитку РМ відбувалося підвищення загального вмісту альдегідів у тканині печінки щурів у 2,9 рази, вмісту протеїнових СО-груп в сироватці крові - в 2,8 рази, в тканині печінки – в 2,8 рази, вмісту ТБК-активних продуктів в печінці - в 1,6 раза, а також багаторазове зростання в нирці, органі-мішені патологічних змін при рабдоміолізі, активності формальдегідутворювального ензиму семікарбазидчутливої амінооксидази (САО) в 3,5 рази в порівнянні з цими показниками у інтактних тварин, що

свідчило про розвиток гіперкарбонільного стану в організмі піддослідних тварин. Двократне зниження каталазної активності каталази свідчить про збільшення чутливості тканини нирки до агресивної дії метаболітів, що утворюються за даних умов (Табл. 3.2, 3.3).

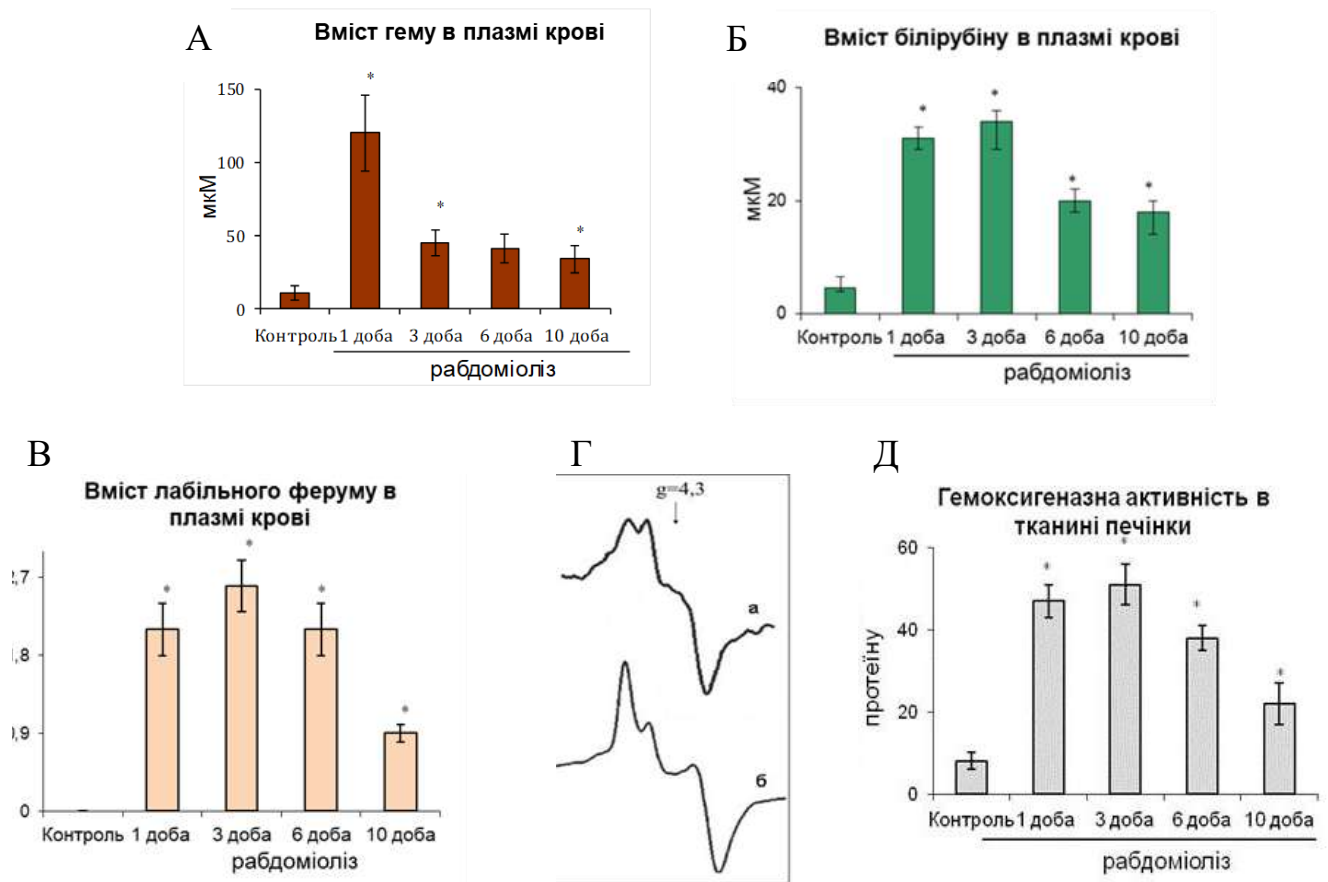


Рис. 3.11. Розвиток РМ супроводжується підвищенням вмісту гему (А) та білірубину (Б), а також появою лабільного феруму (В) зі зміненою формою сигналу ЕПР (Г) в плазмі крові, зростанням ГО активності в тканині печінки (Д). ($M \pm m$, $n=8$, $*p < 0,05$ зміни достовірні відносно контролю); (Г) Сигнали ЕПР феруму (III) з $g=4,3$ у плазмі крові: а – інтактних щурів, класичний сигнал феруму у складі трансферину; б – щурів з РМ, «РМ»-сигнал зі зміненою формою.

Таблиця 3.2

Показники оксидативного стресу щурів на 4-ту добу після введення гліцеролу та після застосування N-АЦ (n=6, M±m)

Експериментальні групи	Вміст альдегідів, мкмоль/г тк.	СО-групи протеїнів, нмоль/мг пр.	ТБК-активні продукти, нмоль/мг пр.	СО-групи протеїнів, нмоль/мг протеїну
	Печінка			Плазма
Контроль	0,13±0,02	1,3±0,2	56±3	1,0±0,1
PM	0,4±0,1*	4,0±1,0*	91±4*	3,4±0,8*
PM + N-АЦ	0,24±0,02**	2,2±0,4**	64±8**	1,8±0,3**

* - результати, що достовірно відрізняються від групи «Контроль» (p(t)<0.05);

** - виділені результати, що достовірно відрізняються від групи «PM» (p(t)<0.05).

Таблиця 3.3

Активність антиоксидантних ензимів та амінооксидаз в нирці та печінці щурів на моделі рабдоміолізу та після застосування N-АЦ (n=6, M±m)

Експериментальні групи	i-NO синтаза, нмоль/мг протеїну	Каталазна активність каталази, мкМ H ₂ O ₂ /хв/мг	Активність САО, нМ H ₂ O ₂ /хв/мг
	Печінка		Нирка
Контроль	0,43±0,02	150 ± 17	139±47
PM	0,84±0,04*	80 ± 25*	537±134 *
PM + N-АЦ	0,62±0,03**	136 ± 17**	298±52**

* - вірогідні зміни відносно групи «Контроль» (p(t)<0.05);

** - вірогідні зміни відносно групи «PM» (p(t)<0.05).

3.3.2 Ефективність застосування N-АЦ для зменшення інтенсивності карбонільного стресу на моделі рабдоміолізу

Через 1 добу після введення гліцеролу тварини перорально отримували 20% розчин N-АЦ та були досліджені ефекти його дії на процеси оксидативного стресу за даних патологічних умов. Результати проведених

досліджень продемонстрували, що використання антиоксиданту N-АЦ призводило до зменшення впливу карбонільних сполук на розвиток патологічного процесу (Таблиці 2, 3; Рис. 3.12). При цьому спостерігалось зниження загального вмісту альдегідів у печінці в 1,6 рази, вмісту протеїнових СО-груп у сироватці крові - в 1,8 рази, а в тканині печінки – в 1,7 рази, вмісту ТБК-позитивних продуктів в печінці – практично до рівня контролю, тоді як активності і-NO синтази в 1,35 рази. Встановлено також, що в органі-мішені даної патології, нирці, активність каталази відновлювалась до рівня контролю, тоді як активність САО знижувалась в 1,8 рази.

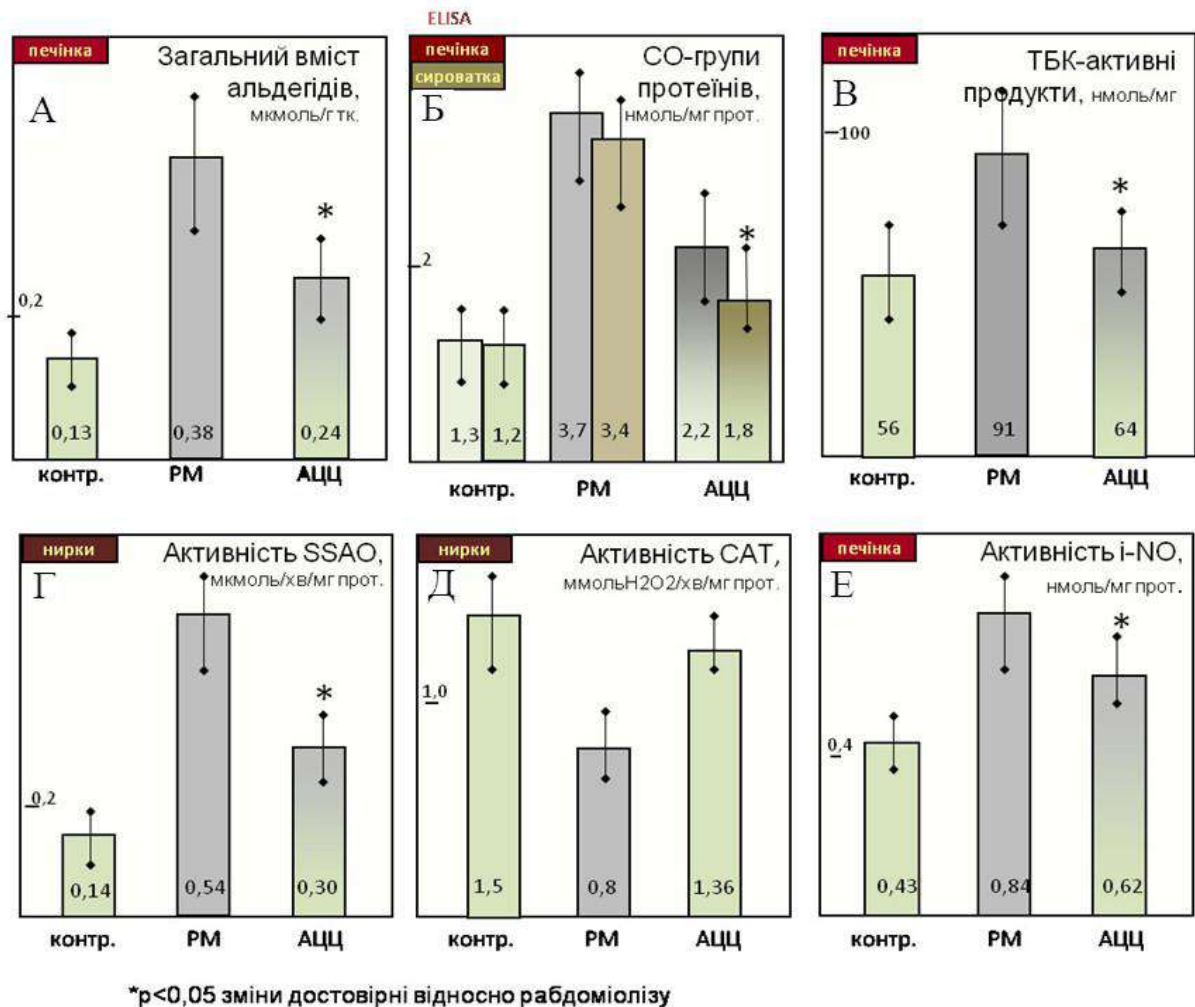


Рис. 3.12. N-АЦ здатний зв'язувати ендogenous реактивні альдегіди (А) та гальмувати розвиток оксидативно/карбонільного стресу (Б – Е) в тканинах щурів за умов експериментального рабдоміолізу (PM).

Таким чином, введення антиоксиданту N-АЦ на фоні індукованого гліцеролом РМ призводить до достовірних змін вимірюваних показників (їх нормалізації), що може бути пояснено, як зв'язуванням лабільного заліза в залізо-сірчаний комплекс, так і здатністю продуктів метаболізму N-АЦ (цистин, цистеїн) утворювати ковалентні комплекси з альдегідами. Таким чином, вищенаведені результати дозволяють стверджувати, що РКС не тільки є продуктами оксидативного стресу, але й самі беруть активну участь у реалізації цього процесу.

3.4 Стрептозотоциновий діабет - модель гіперкарбонільного стану

3.4.1. Біохімічна характеристика розвитку цукрового діабету

На моделі стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету (СТЦД) (Табл. 3.4) нами було зареєстровано підвищення загального вмісту альдегідів в печінці в 2,4 рази порівняно з контролем, що в свою чергу свідчить про розвиток гіперкарбонільного стану [171]. КМЛ як КПП, що характеризують рівень інтенсивності формування модифікацій протеїнів, є наслідком посилення карбонільного стресу. В даному досліді було показано, що вміст КМЛ-аддуктів збільшився в плазмі крові в 2,5 рази порівняно з контролем. Водночас, спостерігалось зростання показників оксидативного стресу. Вміст протеїнових СО-груп в плазмі крові збільшувався в 4,5 рази, в тканині печінки – в 4 рази, що пояснюється особливостями тканевого розподілу альдегідів, як джерела СО-груп, в організмі. Вміст ТБК-продуктів в печінці підвищився удвічі в порівнянні з контролем. Зареєстровано зниження рівня низькомолекулярних відновлених SH-метаболітів (цистеїн, глутатіон, тіосульфат та інші) на 48%.

Таблиця 3.4

Показники оксидативного стресу в сироватці крові та печінці щурів за
СТЦД та його корекції «Комплексною дієтичноюдобавкою при
гіперкарбонільньому стані» (добавка) (n=30)

Експиремантальні групи	Печінка			Сироватка крові	
	Альдегіди, мкмоль/г	СО-групи протеїнів, нмоль/мг протеїну	SH-групи, мкмоль/ г тканини	СО-групи протеїнів, нмоль/мг протеїну	КМЛ, мг/л
Контроль	0,11±0,02	1,1±0,2	7,8±0,8	0,8±0,1	0,33±0,02
СТЦД	0,26±0,05*	4,3±0,9*	4,1±0,6*	3,6±0,7*	0,82±0,13*
СТЦД+Добавка	0,09±0,02**	2,5±0,5**	6,9±1,2**	1,7±0,4**	0,45±0,07**

* P<0,05 відносно групи «Контроль»

** P<0,05 відносно групи «СТЦД»

Продемонстровано також зменшення розчинності колагену шкіри та збільшення ступеня його полімеризації. В клітинних фракціях печінки (Табл. 3.5) виявлено достовірне зростання активності антиоксидантних ензимів: каталази (каталазна активність на 36%) та супероксиддисмутази (в 2,6 рази), та прооксидантної САО (у 2 рази) що є ознакою карбонільного стресу.

Таблиця 3.5.

Активності антиоксидантних ферментів та САО в печінці щурів за
СТЦД та його корекції «Комплексною дієтичноюдобавкою при
гіперкарбонільньому стані» (n=30)

Експиремантальні групи	КАТ-кат, мкмоль H ₂ O ₂ /хв/мг	КАТ-перокс, нмоль ФА/хв/мг	СОД, Од/мг	САО мкмоль H ₂ O ₂ /хв/мг
Контроль	492±13	17,1±3,4	506±47	0,47±0,11
СТЦД	670±46*	21,7±4,7	1327±191*	1,12±0,15*
СТЦД+Добавка	636±49*	7,3±0,5**	928±66**	0,80±0,07**

* P<0,05 відносно норми

** P<0,05 відносно діабету

3.4.2. Ефективність «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» щодо зменшення інтенсивності карбонільного стресу на моделі СТЦД

У разі застосування комплексної дієтичної добавки на моделі СТЦД спостерігалось зниження загального вмісту альдегідів у печінці в 2,8 рази (до рівня контролю) (Рис. 3.13). Таке гальмування карбонільного стресу призвело до зниження вмісту маркера накопичення КПГ, КМЛ, в сироватці крові на 54%. Внаслідок цього, показники оксидативного стресу також зазнали змін: вміст протеїнових СО-груп в сироватці крові знизився на 47%, в тканині печінки – на 58%, вміст ТБК-позитивних продуктів зменшився на 42%,

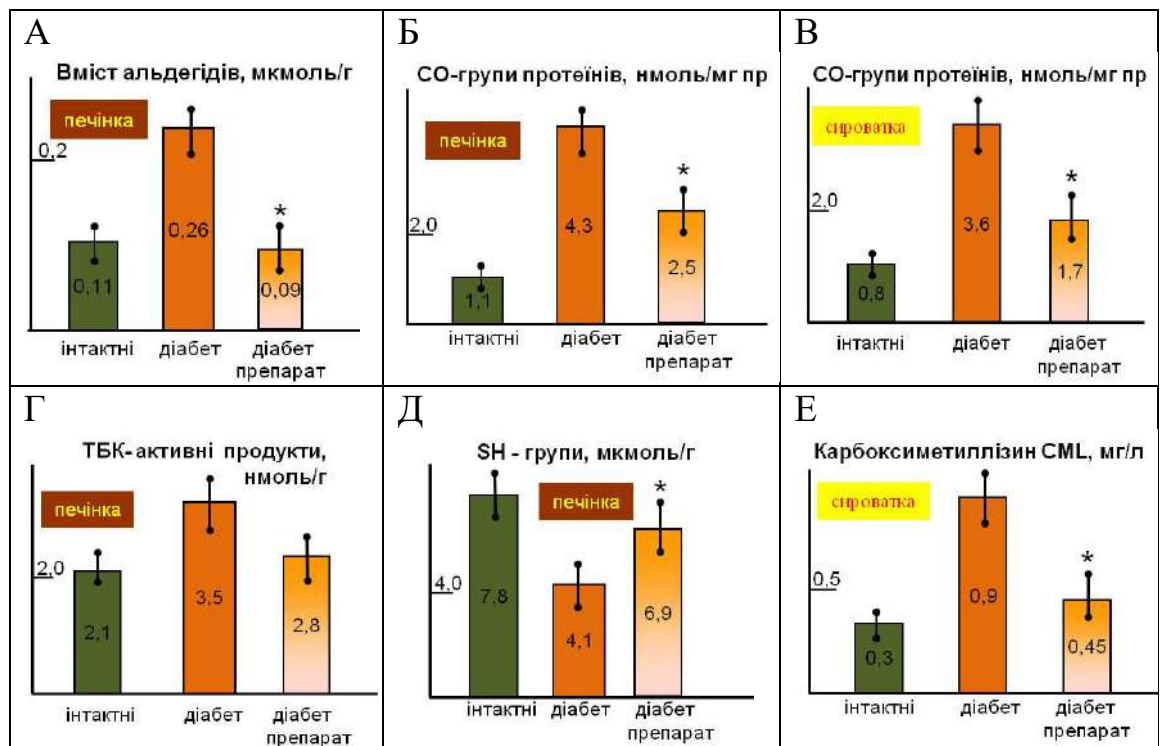


Рис. 3.13. Біохімічні показники, що відображають стан карбонільного стресу, модулюються запропонованою дієтичною добавкою (препарат) в тканинах піддослідних тварин зі стрептозотоцин-індукованим діабетом І типу (* - $p < 0,05$ зміни достовірні відносно діабету).

рівень SH-груп у структурі низькомолекулярних сполук у печінці зріс у 1,7 рази. Зміни останнього показника можуть також свідчити про безпосередню участь ендогенних альдегідів у регулюванні пулу тіоловмісних сполук. При цьому застосування добавки тваринами з СТЦД призводило до нормалізації (тенденції до нормалізації) значень інших показників оксидативно-карбонільного стресу: пероксидазної активності КАТ, активності СОД та САО (Табл.4).

Таким чином, розроблена нами комплексна дієтична добавка ефективно знижувала патогенетичні наслідки гіперкарбонільного стану в тканинах піддослідних тварин за умов СТЦД.

3.5 Семікарбазид-стимульований латиризм - модель гіпокарбонільного стану

3.5.1 Зміни морфометричних показників за умов розвитку латиризму

Хронічне вживання щурами семікарбазиду (акцептора альдегідів) протягом 45 днів призводило до суттєвого зменшення ваги їх тіла [164]. Приріст цього показника у тварин на 21 добу в дослідній групі був на 38%, а на 40 добу – на 43% менший ніж у контрольній, тобто розвиток латиризму призводив до суттєвого відставання в рості тварин (Рис. 3.14). Зміна темпів росту тварин під дією семікарбазиду призвела до диспропорції ваги певних органів. При цьому, масовий коефіцієнт (%*10) дослідних щурів був вищим за норму в таких органах: нирках – майже на 10 % ($6,9 \pm 0,4$ - контроль; $7,6 \pm 0,6$ – дослід); мозку на 40 % ($7,6 \pm 0,6$; $10,6 \pm 1,8$, відповідно); сім'яниках - на 22 % ($13,3 \pm 1,6$; $16,2 \pm 1,2$, відповідно). Водночас, цей показник для тимусу зменшився на 22% ($1,7 \pm 0,2$ -контроль; $1,3 \pm 0,5$ -дослід), що вказує на наявність у дослідних щурів стресового стану.

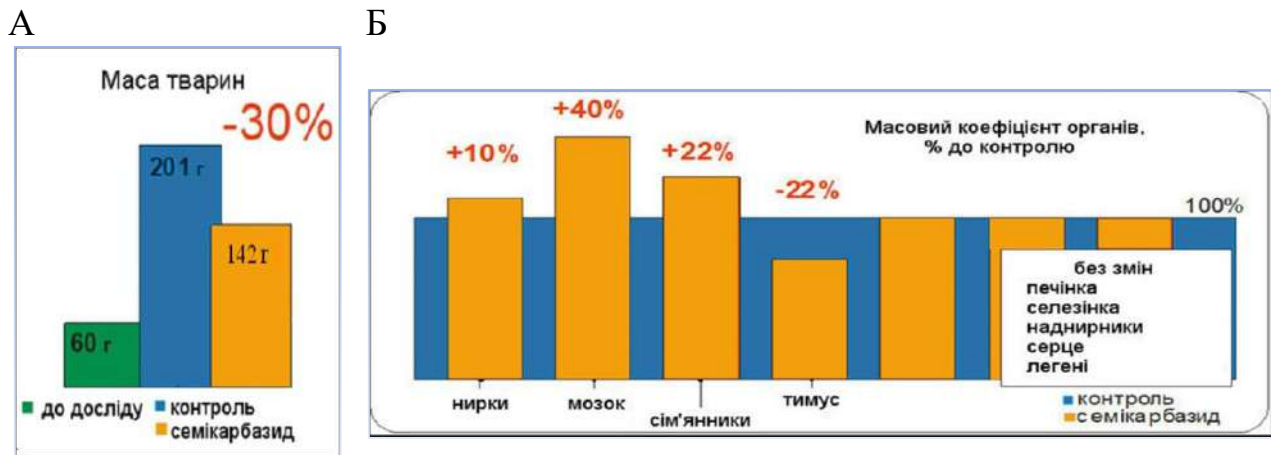


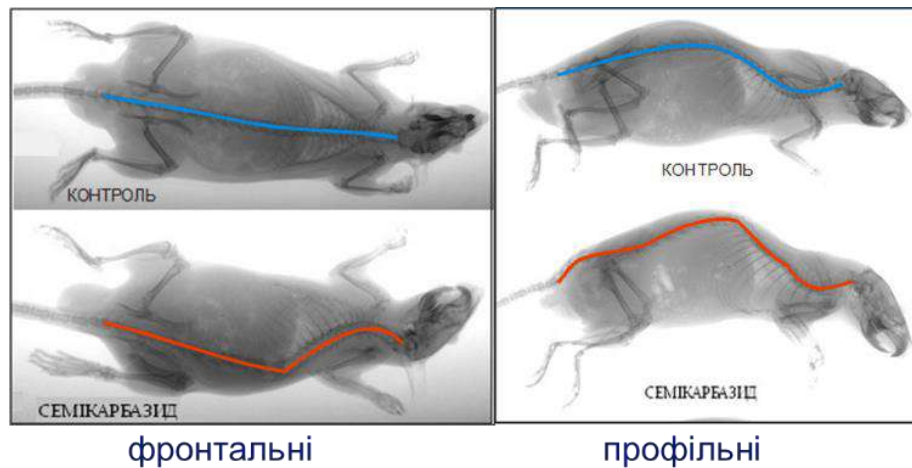
Рис. 3.14. Результатом хронічного введення семікарбазиду тваринам стало збільшення масового коефіцієнту нирок, мозку та сім'яників, найбільш стійких органів за кахексії, та зниження маси щурів і масового коефіцієнту тимусу (показник стресу), що характеризувало розвиток латиризму.

3.5.2 Структурні зміни у будові скелету щурів за латиризму

На рентгенограмах щурів дослідних груп (Рис. 3.15, А), що отримували семікарбазид, чітко простежувались зміни в архітектоніці скелету та різні структурні зміни як у губчастій, так і в компактній речовині кісткової тканини. Зазначені патологічні зміни (Рис. 3.15, Б, В) відбуваються за рахунок гіпокальціємії кісток (зниження кальцію в 1,89 рази у стегновій кістці) та зростання активності лужної фосфатази в сироватці крові в 1,74 рази. Вміст фосфору в золі змінювався несуттєво.

Дослідження мінеральних компонентів великогомілкової кістки показало зниження зольності кістки на 13,5%: контроль – $51,2 \pm 1,7\%$, латиризм – $44,3 \pm 4,4\%$, ($P < 0,05$); зниження вмісту кальцію в золі на 46,5%: контроль – $35,8 \pm 2,9\%$, латиризм – $19,4 \pm 3,9\%$, ($P < 0,05$). Вміст фосфору в золі залишився незмінним. Отримані результати свідчать про те, що розвиток гіпокальціємії є одним з основних чинників патологічних змін в архітектоніці скелета при латиризмі. Порушення структури кісток при розвитку латиризму корелювало із змінами активності лужної фосфатази в сироватці крові: контроль - $(0,4 \pm 0,6)$ мкмоль/л, латиризм - $(7,0 \pm 0,6)$ мкмоль/л ($p < 0,05$).

А



Б



В

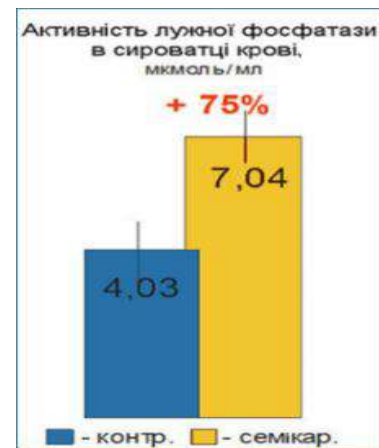


Рис. 3.15. Введення семікарбазиду призводило до суттєвих порушень архітекτονіки скелету піддослідних тварин: (А) рентгенограми, за рахунок змін вмісту мінеральних компонентів у кістках (Б) та підвищення активності лужної фосфатази у сироватці крові (В).

3.5.3 Зміни біохімічних показників за латиризму

Зменшення концентрації альдегідів (Рис. 3.16) в 1,12 рази та активності ЛО в 4,8 рази тканини серця щурів, активності САО в легені – в 1,2 рази, а також зростання активності глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази (АДГЗ) в печінці та мозку в 2 та 1,5 рази, відповідно, свідчить про розвиток гіпокарбонільного стану.

На фоні цього відбувалось посилення окисних процесів та утворення вільних радикалів без накопичення МДА.

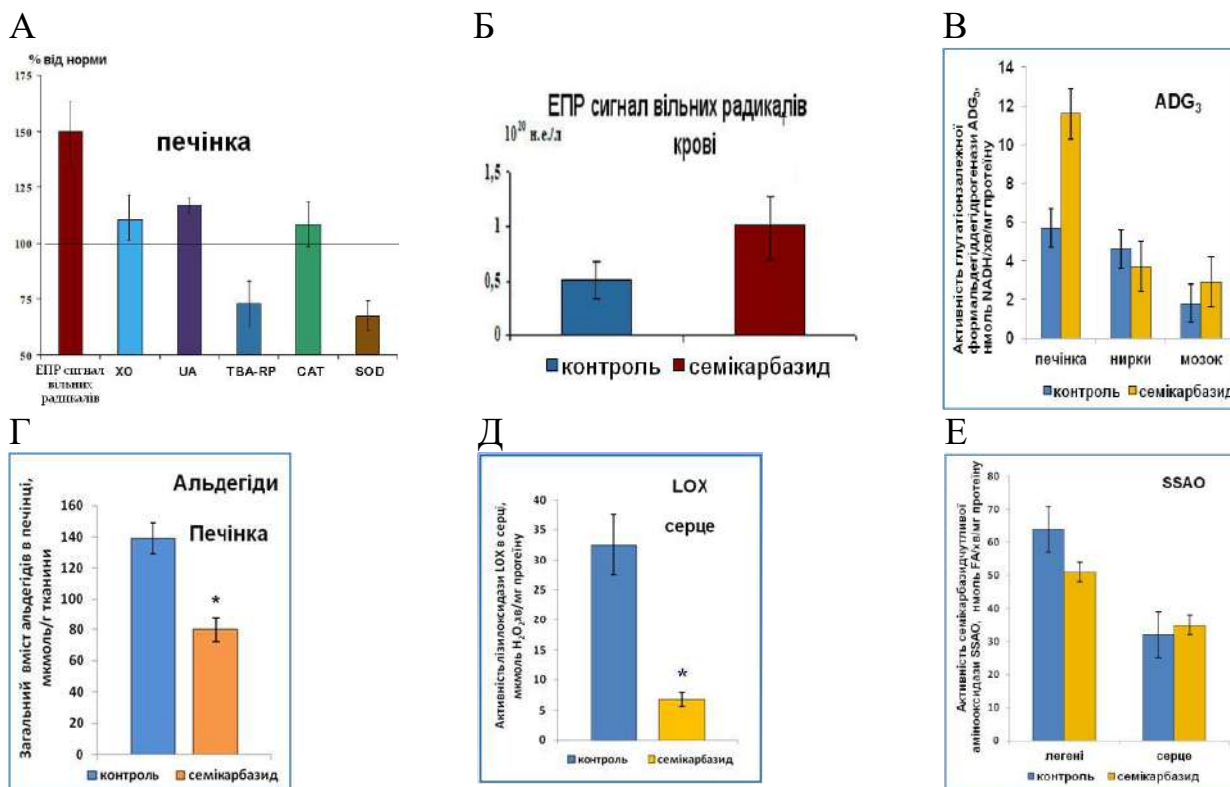


Рис. 3.16. Біохімічні показники тканин (А, В, Г-Е) та ЕПР-сигнали вільних радикалів (А, Б) засвідчили розвиток гіпокарбонільного стану у щурів за умов субхронічного введення семікарбазиду (* - $p < 0,05$ зміни достовірні відносно контролю).

При незмінній первинній структурі колагену шкіри, введення семікарбазиду призводило також до підвищення розчинності глікозаміногліканів та колагену у сполучній тканині, що може бути пов'язано зі зменшенням ступеня міжмолекулярного зшивання фібрил цього протеїну (Рис. 3.17).

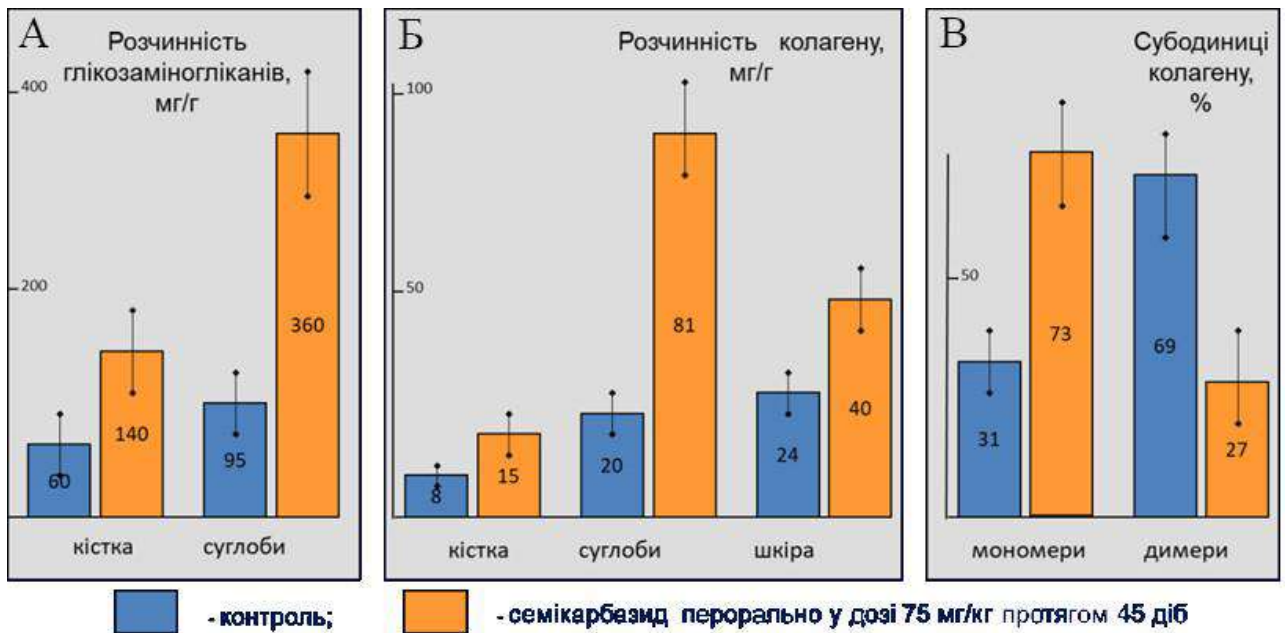


Рис. 3.17. Введення семікарбазиду призводило до підвищення розчинності глікозамінгліканів та колагену (А-В) у сполучній тканині, що може бути пов'язано зі зменшенням ступеня міжмолекулярного зшивання його фібрил (всі зміни достовірні відносно контролю ($p < 0,05$)).

3.6 Карцинома легені Льюїс - модель гіперкарбонільного стану

3.6.1. Біохімічна характеристика розвитку карциноми легені Льюїс

Відомо, що для онкологічних захворювань різного тканевого походження характерним є зростання активностей альдегідоутворювальних ензимів, чутливих до семікарбазиду (САО, ЛО, ДАО), що корелюють з прогресією пухлинного росту [140, 143]. Тому, беручи до уваги експериментальні дані, отримані на попередній моделі (латиризму), було вирішено розробити дієтичну добавку із низьким вмістом семікарбазиду для застосування у комплексному лікуванні онкологічних захворювань. Для досягнення цієї мети, креатин попередньо обробляли гіпохлоритом [172]. В результаті, після взаємодії з джерелом іонів хлору незначна кількість молекул креатину за підібраних нами умов перетворювалась у семікарбазид. За нашими підрахунками, з 30 г/л креатину обробленого 0,015% гіпохлоритом

утворюється 240 мкг семікарбазиду, тобто утворюється 3,2 мкМ розчин семікарбазиду (0,00024%).

Для встановлення експериментальної мишачої моделі карциноми легені Льюїс було сформовано 6 експериментальних груп (Рис. 3.18). Тваринам 3 груп

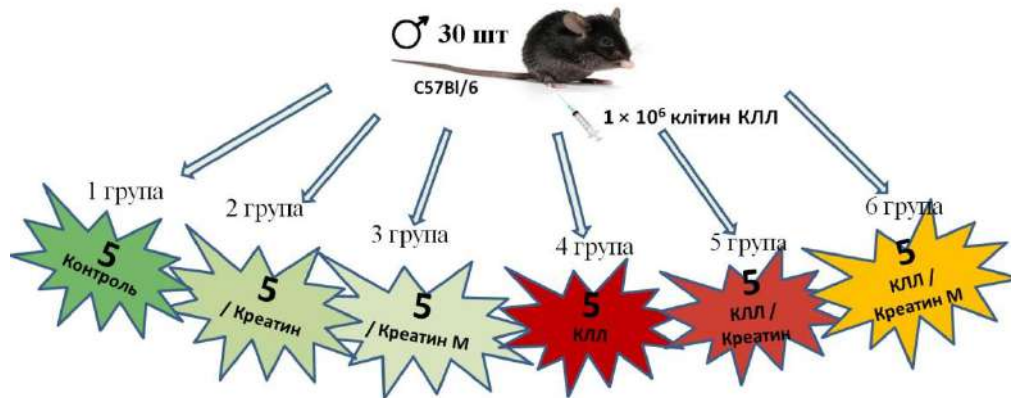


Рис. 3.18. Схема експерименту по дослідженню впливу препарату на основі модифікованого креатину на перебіг КЛЛ у мишей.

було ін'єкковано клітини карциноми легені Льюїс (КЛЛ), ще 3 групи склали інтактні тварини. Одна група інтактних тварин та група тварин з КЛЛ отримували немодифікований креатин (30 г/л) замість питної води, №2, («Контроль+Креатин») та №5, «КЛЛ+Креатин», відповідно. Ще одна пара таких груп отримувала «Добавку дієтичну для застосування при онкологічних захворюваннях» (30 г/л) (Креатин модифікований (Креатин М)) також замість питної води (№3 - «Контроль+Креатин М» та №6 – «КЛЛ+Креатин М») (Рис. 3.18). Тварин виводили з експерименту на 28 добу.

Встановлено, що вага тіла тварин за умов розвитку пухлинного росту залишалась в межах норми (Табл. 3.6), тоді як всі інші показники зазнавали змін за цих умов. Після перевивання тваринам клітин КЛЛ, розвинута первинна пухлина стала причиною метастатичного процесу в органі-мішені даної патології – легені, про що свідчило збільшення більше ніж у 2 рази

маси легені тварин з онкологією (група №4, табл. 3.6) у порівнянні з групою інтактних тварин (група №1, Табл. 3.6). Поява метастазів корелювала із

Таблиця 3.6.

Вплив креатину та препарату на основі модифікованого креатину на морфометричні показники мишей C57BL/6 за умов норми та карциноми Льюїс (КЛЛ) ($M \pm m$, $n=30$)

№ п/п	Експериментальні групи	Показники			
		Вага тіла,г	Маса пухлини, г	Маса легені, мг	Маса печінки, г
1	Контроль	23,7 ± 0,47	-	152 ± 13	0,98 ± 0,1
2	Контроль+Креатин	21,9 ± 1,21	-	164 ± 16	1,00 ± 0,1
3	Контроль+ Креатин М	22,8 ± 1,04	-	162 ± 16	1,00 ± 0,1
4	КЛЛ	25,7 ± 2,57	5,33 ± 0,53	331 ± 32*	1,32 ± 0,1*
5	КЛЛ+ Креатин	23,0 ± 1,91	4,17 ± 0,53	331 ± 40*,***	1,03 ± 0,1
6	КЛЛ+ Креатин М	20,2 ± 0,63*	4,35 ± 0,46	203 ± 19**	0,99 ± 0,2

*Р відносно Контролю <0,05

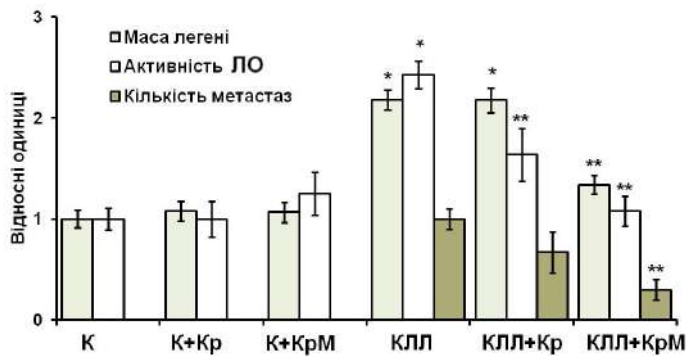
**Р відносно КЛЛ <0,05*

***Р відносно К+Креатин <0,05

****Р відносно К+препарат <0,05

зростанням в даній тканині активності ЛО (у 2,5 рази), яка відповідає за формування структури позаклітинного матриксу шляхом утворення аллізину, та подальших його перетворень, а також відносного рівня експресії мРНК цього ензиму у 4 рази відносно контролю (Рис. 3.19 А, Б), в такому ж ступені як і маса органу. Враховуючи достовірне збільшення маси головного метаболічного органу печінки в 1,33 рази, ми припустили наявність інвазивного процесу і в цьому органі (Табл. 3.6), що також корелювало зі зростанням в цій тканині активності ЛО у 3,5 рази відносно групи інтактних мишей (Рис. 3.20).

А



Б

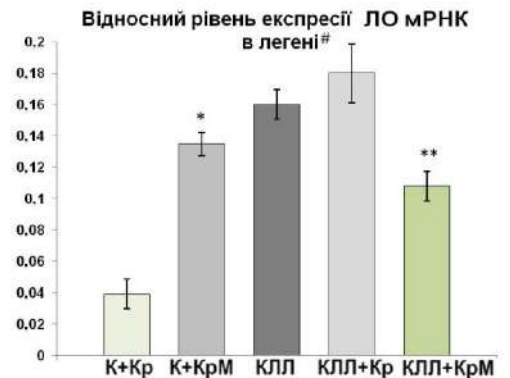


Рис. 3.19. Вплив креатину (Кр) та препарату на основі модифікованого креатину (КрМ) на кількість метастазів, активність ЛО (А) та рівень експресії мРНК даного ензиму (Б) в легені мишей C57BL/6 за умов норми та КЛЛ, ($M \pm m$, $n=30$).

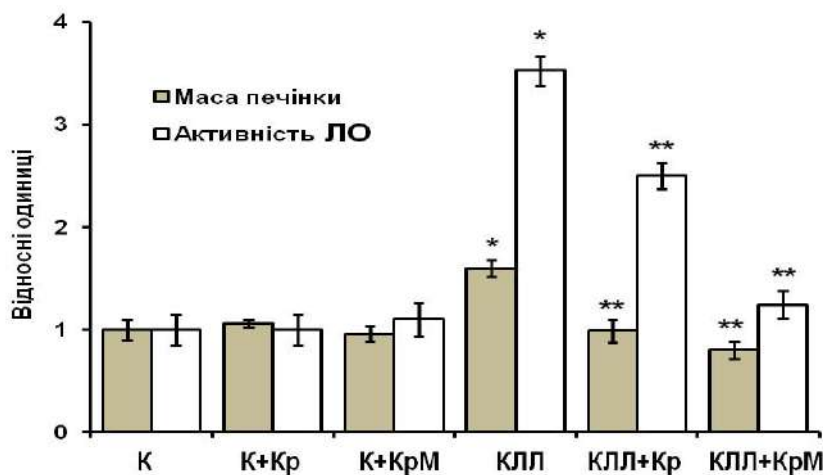


Рис. 3.20. Вплив креатину (Кр) та препарату на основі модифікованого креатину (КрМ) на морфометричні показники та активність ЛО в печінці мишей C57BL/6 за умов норми та КЛЛ, ($M \pm m$, $n=30$)

Дослідженнями останніх років доведено участь іншої мідьвмісної чутливої до семікарбазиду амінооксидази САО в процесах метастазування. Так, за умов розвитку онкології спостерігалось достовірне зростання активності цього ензиму в легені в 1,5 рази відносно контрольної групи. Визначення активності ензимів, залучених до катаболізму поліамінів, ДАО та ПАО, показало достовірне зростання цих показників за умов онкології у 1,5 та 2 рази, відповідно, в порівнянні з контрольною групою (Рис. 3.21). Це може

свідчити про залучення до канцерогенезу поліамінів (путресцину, сперміну та спермідину) [143].

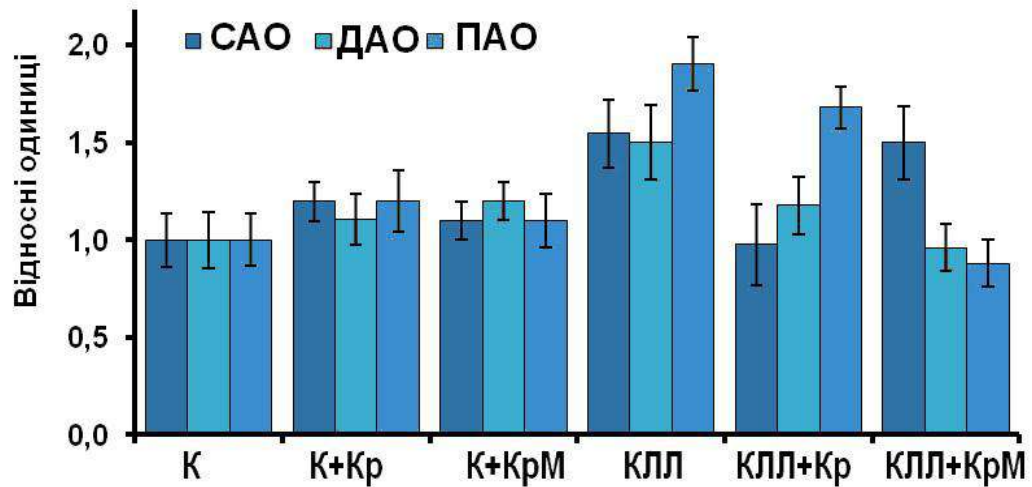


Рис. 3.21. Вплив креатину (Кр) та препарату на основі модифікованого креатину (КрМ) на активності амінооксидаз в легені(А) та печінки (Б) мишей C57BL/6 за умов норми та КЛЛ ($M \pm m$, $n=30$).

Визначення активностей САО, ДАО, ПАО в печінці піддослідних тварин показало, що за умов розвитку онкології в даній тканині спостерігалось достовірне зниження майже у 2 рази цих показників відносно групи інтактних мишей (Рис. 3.22).

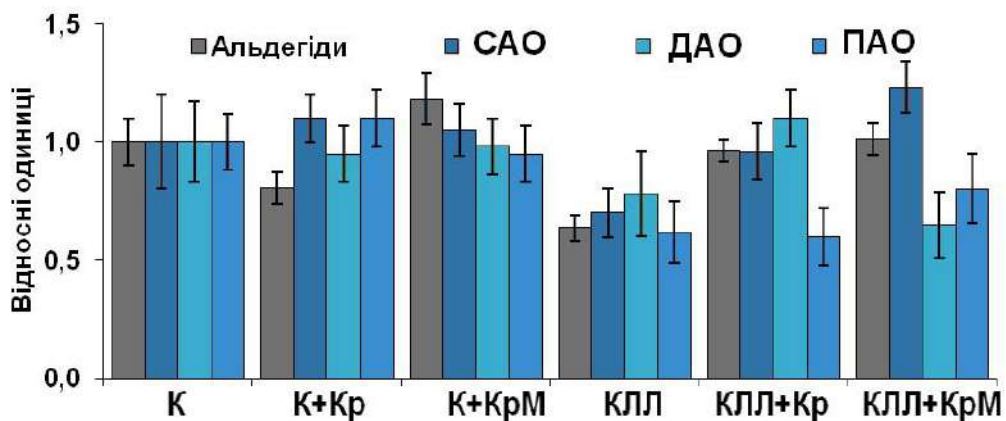


Рис. 3.22. Вплив креатину та препарату на основі модифікованого креатину на вміст альдегідів та активності амінооксидаз печінки мишей C57BL/6 за умов норми та КЛЛ. ($M \pm m$, $n=30$)

Це корелювало із зниженням вмісту альдегідів в печінці в тому ж ступені, що й активностей амінооксидаз, що свідчить про непричетність даної ланки метаболізму в цій тканині до перебігу патології, що вивчалась.

3.6.2. Ефективність «Добавки дієтичної для застосування при онкологічних захворюваннях» для зменшення інтенсивності карбонільного стану на моделі первинної карциноми Льюїс

Вживання тваринами під час прогресування онкологічного процесу замість питної води «Добавки дієтичної для застосування при онкологічних захворюваннях» (група №6) достовірно знижувало масу первинної пухлини та активність ЛО в 1,3 та 3 рази (Рис. 3.23), відповідно, в порівнянні з групою

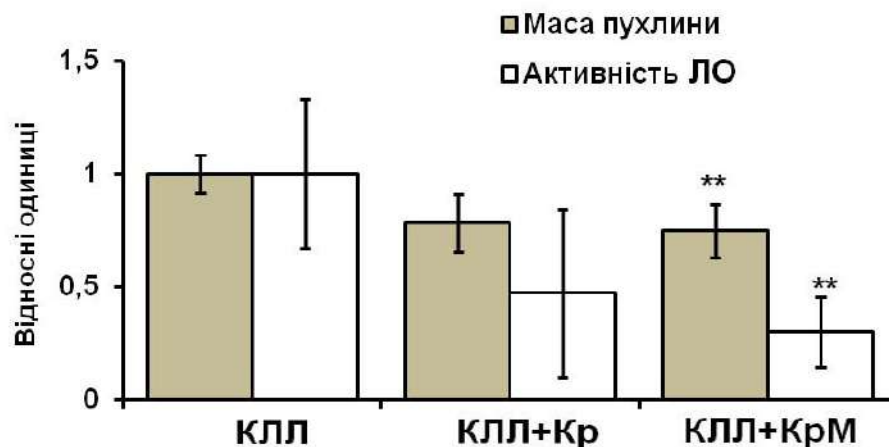


Рис. 3.23. Вплив креатину (Кр) та препарату на основі модифікованого креатину (КрМ) на масу первинної пухлини та активність в ній ЛО у мишей C57BL/6 за умов умов прогресування онкологічного процесу ($M \pm m$, $n=15$).

тварин-пухлиноносіїв, які не отримували лікування (група №4), що свідчить про ефективність у складі розробленого препарату на основі модифікованого креатину семікарбазиду, необоротного інгібітора ЛО, щодо пухлинного росту, оскільки вживання тваринами за цих умов немодифікованого креатину (група №5) не викликало достовірних змін цих показників.

Застосування розробленої добавки тваринами групи №6 (КЛЛ+Препарат) призводило до нормалізування активності ЛО в легені

мишей, що корелювало із зміною відносного рівня експресії мРНК цього протеїну (Рис. 3.19. А, Б). Такий ефект забезпечував утворений за умов модифікації креатину семікарбазид, оскільки дана добавка не впливала на активність ЛО інтактних тварин і немодифікований креатин сам по собі не викликав змін цього показника ні в інтактних, ні в мишей-пухлиносоїв. Треба відмітити, що вживання препарату інтактними тваринами збільшувало відносний рівень експресії мРНК ЛО більше ніж у 3 рази (Рис. 3.19, Б), що може бути пов'язано із застосуванням праймерів до LOXL2 при проведенні ПЛР аналізу, тоді як активність ензиму визначалась як сумарний показник.

Вживання модифікованого креатину хворими тваринами не впливало на активність САО в легені, проте достовірно знижувало активність ДАО та ПАО у 2 рази (Рис. 3.21). Оскільки добавка на впливали на ці показники в легені тварин групи №3, а немодифікований креатин – груп №№2 та 5, це може свідчити, по-перше, про причетність обміну поліамінів до розвитку онкологічного процесу в тканині органу-мішені, а по-друге, про ефективність розробленого лікувального препарату. Треба відмітити, що в печінці мишей з пухлиною під впливом розробленого препарату спостерігалось відновлення вмісту альдегідів та активності САО до рівнів норми (Рис. 3.22).

Цікавими є також дані стосовно зниження рівнів активності ДАО і ПАО в легені тварин-пухлиноносіїв під впливом модифікованого креатину і, навпаки, відновлення вмісту альдегідів та активності САО в печінці до рівнів норми.

Таким чином, застосування препарату на основі модифікованого креатину, як необоротного інгібітора мідь-вмісних амінооксидаз, нормалізувало як морфометричні, так і біохімічні показники досліджених тканин на моделі карциноми легені Льюїс.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Дисертаційна робота присвячена вивченню ролі альдегідів у патогенезі низки захворювань, з'ясуванню механізмів їх регуляторної та токсичної дії в організмі, а також пошуку нових засобів для зменшення патологічних наслідків їх гіперпродукування.

В проведених дослідженнях *in vitro* було вивчено закономірності утворення основних продуктів глікування ЛСА, лізину та желатини на різних етапах їх інкубації з такими альдегідами: метилглюксаль, глюксаль, дезоксирибоза, рибоза, формальдегід, акролеїн). Цей процес супроводжувався утворенням ранніх, проміжних та кінцевих продуктів реакції Майяра, які відрізнялись за своїми біохімічними, фізико-хімічними та спектральними характеристикам.

Отримані результати *in vitro* дають змогу стверджувати, що під впливом альдегідів відбуваються зміни в структурі протеїнів вже на ранніх строках інкубації: окислення, яке характеризує збільшення рівня утворених карбонільних груп, утворення численних хромофоровмісних сполук, про що свідчить інтенсивність флуоресценції, та перерозподіл фракцій протеїнів у високомолекулярну область за рахунок інтенсивного міжмолекулярного зшивання. Карбонілювання протеїнів та утворення флуоресцентних аддуктів під дією альдегідів є процесами динамічними, різноспрямованими і, в результаті, синергічними за характером, тобто за умов комбінованої дії РКС спостерігаються збільшення/зменшення кількості СО-груп протеїнів та зменшення/збільшення інтенсивності «блакитної» флуоресценції, відповідно, в порівнянні з дією кожного з ефекторів окремо. При цьому модифікувальні властивості альдегідів відрізняються і залежать від їх хімічної будови. Встановлено наступний рейтинг диференційної активності РКС (від найактивнішої): МГЛ, ГЛ, ДРБ, РБ, ФА, АКР. Крім того, з'ясовано деякі особливості дії окремих альдегідів. Так, при взаємодії з колагеном або желатиною ФА виявляє антагонізм за умов комбінованої дії з іншими

альдегідами щодо утворення флуоресцентних аддуктів, зокрема зменшує інтенсивність флуоресценції колагену в комбінації з МГЛ у порівнянні з ефектом останнього на даний показник окремо. Антагоністичні властивості ФА при комбінованій дії з іншими альдегідами можуть бути використані для послаблення модифікації структури компонентів ПКМ та протеїнів при карбонільному стресі.

Враховуючи отримані дані щодо здатності альдегідів активно вступати в реакцію з аміногрупами протеїнів, а також дані літератури стосовно аналогічної реакції альдегідів з відновленими тіолами (цистеїном, GSH), було розроблено та застосовано препарат, який містить гліцин, лізин та потенційний акцептор альдегідів N-ацетил-L-цистеїн, з антиоксидантними та антитоксичними властивостями для нормалізації рівня ендогенних альдегідів та зменшення відповідних протеїнових модифікацій при гіперпродукуванні альдегідів. Антиоксидантна дія N-АЦ пов'язана з властивістю вільної SH-групи руйнувати внутрішньо- та міжмолекулярні S-S-зв'язки агрегатів глікопротеїнів. Відомо також, що ця сполука легко проникає в клітину та вивільняє L-цистеїн – амінокислоту, що необхідна для синтезу важливого низькомолекулярного антиоксиданту глутатіону. Водночас, антитоксичний ефект N-АЦ може бути пов'язаний зі здатністю продуктів його метаболізму (цистин, цистеїн) утворювати ковалентні комплекси з альдегідами. Дослідним шляхом було визначено концентраційну залежність впливу цього препарату на вміст ФА в гомогенаті печінки щура, що було використано в подальших дослідях *in vivo*.

За умов моделювання рабдоміолізу індукується потужний оксидативний стрес за рахунок вивільнення у кров'яне русло внутрішньоклітинного вмісту міоцитів та накопичення значної кількості окисленого заліза в крові, що не зв'язане із залізотранспортним протеїном – трансферином. Як наслідок цих подій, в організмі тварин було зафіксовано багаторазове підвищення рівнів РКС, як маркера карбонільного стресу. При

цьому N-АЦ зменшував вплив цих карбонільних сполук на розвиток оксидативно/карбонільного стресу (як за вмістом продуктів, що реагують з ТБК, так і карбонільних груп протеїнів), що свідчить про причетність альдегідів до стимулювання та прискорення розвитку патології.

Діабет, як і деякі інші хвороби, що призводять до порушень обміну речовин, супроводжується глюкозурією та гіперпродукуванням інших редуковальних моносахаридів, внаслідок чого посилюється утворення КПП та КПЛ, які прямо або через специфічні рецептори впливають на сигнальну трансдукцію, змінюють структуру і функції рецепторів, протеїнів позаклітинного матриксу, метаболічних ензимів та ензимів антиоксидантного захисту; викликають запалення і апоптоз, що спричинює розвиток ускладнень при патологіях різного генезу. На моделі СТЦД у щурів продемонстровано підвищення загального вмісту альдегідів в тканинах, що характеризує розвиток гіперкарбонільного стану. Рівень інтенсивності формування КПП (за вмістом КМЛ) свідчив про модифікації протеїнів внаслідок посилення карбонільного стресу, який супроводжувався розвитком оксидативного стресу (за вмістом протеїнових СО-груп, ТБК-продуктів, низькомолекулярних відновлених SH-метаболітів (цистеїн, глутатіон, тіосульфат та ін.) в тканинах тварин. Застосування «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» призводило до послаблення інтенсивності карбонільного стресу за рівнем вказаних вище показників, що довело ефективність розробленого терапевтичного засобу.

Як було показано на прикладі експериментальних моделей РМ та СТЦД, збільшення вмісту альдегідів вище фізіологічних меж було головним чинником розвитку ускладнень цих патологічних станів. У свою чергу, надмірне зниження цього показника та формування гіпокарбонільного стану також має драматичні наслідки для організму ссавців, що було продемонстровано на моделі латиризму, викликаного субхронічним введенням семікарбазиду піддослідним тваринам. Відомо, що біологічно

активна сполука семікарбазид інтенсивно досліджується в різних лабораторіях з метою розробки засобів для комплексного лікування різноманітних захворювань. Однак, детальні механізми його біологічної дії до кінця не з'ясовані. При взаємодії з формальдегідом семікарбазид утворює семікарбазон, тобто виступає модулятором обміну альдегідів в організмі, безпосередньо зв'язуючи їх. Крім того, семікарбазид є необоротним інгібітором альдегідоутворювальних ензимів, зокрема, САО, що каталізує утворення в організмі високотоксичних альдегідів з первинних амінів, які разом з іншими реактивними сполуками пошкоджують здорові клітини та їх генетичний апарат. Оскільки нами показано, що ступінь підвищення активності САО корелює з важкістю ускладнень за діабету, то дія семікарбазиду на рівень активності даного ензиму в плазмі крові може виявляти терапевтичний ефект.

Результати проведених досліджень свідчать, що довготривале введення щурам семікарбазиду призводить до суттєвого зниження ваги і співвідношення величин масового коефіцієнта органів, змін в архітектоніці скелету та мінеральному складі кісток, посилення катаболізму пуринів, прооксидантних процесів, зниження активності САО, СОД, концентрації альдегідів, збільшення активності АДГЗ та лужної фосфатази. Інгібування активності ЛО під дією семікарбазиду в організмі дослідних тварин, у свою чергу, призводить до значних змін в ПКМ кісток, суглобів і шкіри, зокрема його колагенових структур, що було однією з головних причин розвитку даної патології. Отримані дані не тільки підтверджують важливість підтримання рівня РКС в організмі в фізіологічних межах, але й засвідчують можливість застосування семікарбазиду в терапевтичних цілях за умов розвитку патологічних станів, які супроводжуються гіперактивацією чутливих до даної сполуки ензимів.

Так, за умов розвитку карциноми легені Льюїс у мишей, використання модифікованого креатину (з концентрацією семікарбазиду 0,00024%)

призводило до зниження рівня оксидативно/карбонільного стресу в тканині органу-мішені даної патології за рахунок пригнічення активності ключового ензиму модифікації структурно-функціонального стану ПКМ, ЛО, а також ДАО та САО, і, як наслідок, пригнічення пухлинного процесу.

Одержані результати свідчать про те, що альдегіди є важливим біохімічним чинником розвитку патологій, що супроводжуються карбонільним стресом (Рис. 3.24) як за зменшення (латиризм), так і за збільшення (СТЦД, РМ, КЛЛ) їх вмісту. На експериментальних тваринних моделях продемонстровано, що застосування розроблених нами комплексних дієтичних добавок дає можливість зменшити наслідки карбонільного та оксидативного стресу і покращити перебіг змодельованих патологічних станів.



Рис. 3.24. Особливості впливу альдегідів, залежно від їх концентрації, на розвиток патологічних станів та розробка можливих підходів до їх корекції.

Результати проведених досліджень дозволяють вважати доведеною ефективність застосування комплексних дієтичних добавок та їх компонентів в досліджах *in vitro* та для пригнічення карбонільного стресу на моделях рабдоміолізу й діабету (за зменшенням загального вмісту альдегідів та послабленням інтенсивності постсинтетичних модифікацій протеїнів) та карциноми мишей Льюїс. Препарати є перспективними для застосування у комплексних фармакологічних програмах лікування захворювань з вираженим гіперкарбонільним станом.

ВИСНОВКИ

Проведено комплекс експериментальних робіт, які засвідчили існування особливостей модифікації альбуміну сироватки крові людини, колагену, лізину за участі альдегідів, що утворюються ендогенно в організмі людини і тварин, та їх комбінацій *in vitro*, системну участь альдегідів у молекулярних механізмах розвитку оксидативно-карбонільного стресу і, як наслідок, патогенезу низки захворювань на тваринних моделях як за умов посилення (рабдоміоліз, стрептозотоцин-індукований діабет, карцинома легені Льюїс), так і пригнічення (латиризм) їх продукування. Зазначені дослідження лягли в основу розробки методів зниження токсичного впливу альдегідів за допомогою дієтичних добавок, на які були отримані відповідні патенти.

1. Встановлено, що альдегіди (рибоза, гліюксаль, метилгліюксаль, та формальдегід) відрізняються за інтенсивністю утворення протеїнових модифікацій, таких як карбонілювання протеїнів, утворення флуоресцентних аддуктів, формування міжмолекулярних протеїнових зшивок. Визначені шкали активності цих альдегідів за дослідженими властивостями не співпадають. Зокрема, формальдегід та метилгліюксаль утворюють незначну кількість флуоресцентних аддуктів, але мають найвищу полімеризувальну активність.

2. Встановлено, що потенційний акцептор альдегідів N-ацетил-L-цистеїн дозволяє зменшити вплив карбонільних сполук на розвиток оксидативно/карбонільного стресу за умов рабдоміолізу, індукованого гліцеролом. Виявлені ефекти можуть бути пов'язані зі здатністю продуктів метаболізму N-ацетил-L-цистеїну (цистин, цистеїн) утворювати ковалентні комплекси з альдегідами.

3. На моделі цукрового діабету I типу у щурів показано, що застосування «Комплексної дієтичної добавки при гіперкарбонільному стані» призводить до послаблення інтенсивності гіперкарбонільного стану за

такими показниками як зменшення загального рівня альдегідів, вмісту альдегідомодифікованих протеїнів (КМЛ), карбонільних протеїнових груп, а також підвищення вмісту низькомолекулярних тіолвмісних сполук.

4. Встановлено, що довготривале введення щурам семікарбазиду (акцептора альдегідів) призводить до суттєвого зниження ваги і співвідношення величин масового коефіцієнта органів, змін в архітектоніці скелету та мінеральному складі кісток та посилення катаболізму пуринів, прооксидантних процесів, зниження активності семікарбазидчутливої амінооксидази, супероксиддисмутази та лізілоксидази, концентрації альдегідів, збільшення активності глутатіонзалежної формальдегіддегідрогенази та лужної фосфатази.

5. За умов перевивної карциноми Льюїс, використання модифікованого креатину (з концентрацією семікарбазиду 0,00024%) призводило до зниження рівня оксидативно/карбонільного стресу в легені мишей за рахунок пригнічення активності ключового ензиму модифікації структурно-функціонального стану позаклітинного матриксу, лізілоксидази, та ензимів окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів (діамінооксидази та поліамінооксидази) і, як наслідок, пригнічення пухлинного процесу.

Ключові слова: альдегіди, діабет, рабдоміоліз, латиризм, карцинома легень Льюїс, гіперпродукування альдегідів, гіпопродукування альдегідів

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Calvert JG, Albright LF, Brennan E, Brooks SM, Hollowell CD. et al. Formaldehyde and Other Aldehydes. W.: National Academy Press D.C, 1981. 340 p.
2. LoPachin RM, Gavin T. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(7):1081-1091.
3. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto Jr GJ. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2005;44(45):7342-7372.
4. Habchi J, Tompa P, Longhi S, Uversky VN. Introducing protein intrinsic disorder. *Chem Rev*. 2014;114(13):6561-6588.
5. Haesen S, Cöl Ü, Schurgers W, Evens L, Verboven M, Driesen RB. Glycolaldehyde-modified proteins cause adverse functional and structural aortic remodeling leading to cardiac pressure overload. *Sci Rep*. 2020;10(1):12220.
6. Garaycochea JI, Crossan GP, Langevin F, Daly M, Arends MJ, Patel KJ. Genotoxic consequences of endogenous aldehydes on mouse haematopoietic stem cell function. *Nature*. 2012;489(7417):571-575.
7. Prakash VR, Perry G, Smith MA. Brain Composition: Age-Related Changes. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009:313-316.
8. Laggner H, Gmeiner BM. Chapter One - Investigating the Role of H₂S in 4-HNE Scavenging. *Methods in Enzymology*. 2015;555:3-18.
9. Tsukahara H, Ohta N, Hiraoka M, Uchiyama M. Concentrations of pentosidine, an advanced glycation end-product, in umbilical cord blood. *Free Radic Res*. 2004;38(7):691-695.

10. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006;29(6):1420-1432.
11. Guillén MD, Goicoechea E. Toxic oxygenated alpha, beta-unsaturated aldehydes and their study in foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008;48(2):119-36.
12. Cooksey RC, Jouihan HA, Ajioka RS, Hazel MW, Jones DL. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology*. 2004;145(11):5305-5312.
13. Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. Oxidative stress: Biomarkers and novel therapeutic pathways. *Exp Gerontol*. 2010;45(3):217-234.
14. Keltz E, Fahmi Yousef Khan FY, Mann G. Rhabdomyolysis. The role of diagnostic and prognostic factors. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;3(4):303-12.
15. Torres PA, Helmstetter JA, Kaye AM. Rhabdomyolysis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Ochsner J*. Spring 2015;15(1):58-69.
16. Dixit GP, Parihar AK, Bohra A, Singh NP. Achievements and prospects of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) improvement for sustainable food production. *The Crop Journal*. 2016(1):1-10.
17. Singh SP, Bhawnani D, Parihar A, Verma N. An epidemiological study on incidence and determinants of Lathyrism. *The Journal of Community Health Management*. 2016;3(3):113-122.
18. Venkitaraman AR, Narvaez AJ, Ber S, Crooks A, Emery A, Hardwick B, Guarino Almeida E, Huggins DJ, Perera D, Roberts-Thomson M, Azzarelli R, Hood FE, Prior IA, Walker DW, Boyce R, Boyle RG, Barker SP, Torrance CJ, McKenzie GJ. Modulating Protein-Protein Interactions of the

- Mitotic Polo-like Kinases to Target Mutant KRAS. *Cell Chem Biol.* 2017;24(8):1017-1028.
19. Дмитренко М.П., Холіан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. *Укр. біох. журн.* 2007;79(5):72-90.
 20. Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology.* 1978;52(6):302-10.
 21. Raju TS. Co- and Post-Translational Modifications of Therapeutic Antibodies and Proteins. 2019:1-15
 22. Locasale JW. Serine, glycine and the one-carbon cycle: cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer.* 2013 13(8):572–583.
 23. Kuykendall JR, Kuykendall NS. Aldehydes. *Comprehensive Toxicology.* 2018;(15):352-388.
 24. Roede JR, Fritz KS. Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes. *Comprehensive Toxicology.* 2010;(9):581-594.
 25. O'Brien PJ, Siraki AG, Shangari N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Critical Reviews in Toxicology.* 2005;35:609-662.
 26. Ellis EM. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* 2007;115(1):13–24.
 27. Ishii T, Yamada T, Mori T, Kumazawa S, Uchida K, Nakayama T. Characterization of acrolein-induced protein cross-links. *Free Radic Res.* 2007;41(11):1253-1260.
 28. Pamplona R. Advanced lipoxidation end-products. *Chem. Biol. Interact.* 2011;192(1-2):14-20.

29. Petrova KV, Millsap AD, Stec DF, Rizzo CJ. Characterization of the deoxyguanosine-lysine cross-link of methylglyoxal. *Chem Res Toxicol*. 2014;16;27(6):1019-1029.
30. Heck H, Casanova M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 2004;40(2):92–106.
31. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Jordi Boada J, Rainer Brenke R. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radical Research*. 2010;44(10):1125-1171.
32. Nemlet I. Methylglyoxal in food and living organisms. *Mol. Nut. Food Res*. 2006;50(12):1105–1117.
33. Breusing N, Grune T, Andrisic L, Atalay M, Bartosz G, Biasi F. An inter-laboratory validation of methods of lipid peroxidation measurement in UVA-treated human plasma samples. *Free Radical Research*. 2010;44(10):1203-1215.
34. Desai SN, Farris FF, Ray SD. Lipid Peroxidation. *Encyclopedia of Toxicology*. 2014:89-93.
35. Snedeker JG, Gautieri A. The role of collagen crosslinks in ageing and diabetes - the good, the bad, and the ugly. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(3):303–308.
36. Meerwaldt R, Links T, Zeebregts C, Tio R, Hillebrands JL, Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2008;7:29.
37. Goldin A, Beckman JA, Schmidt, AM; Creager MA. Advanced Glycation End Products. *Circulation*. 2006;114:597-605.
38. Pourmotabbed T, Creighton DJ. Substrate specificity of bovine liver formaldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1986;261(30):14240-14244.

39. Creighton DJ, Migliorini M, Pourmotabbed T, M K Guha MK. Optimization of efficiency in the glyoxalase pathway. *Biochemistry*. 1988;27(19):7376-7384.
40. Jürgens G, Chen Q, Esterbauer H, Mair S, Ledinski G, Dinges HS. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein. *Arterioscler Thromb*. 1993;13(11):1689-1699
41. Shaw P, Horkko S, Chang M, Curtiss L, Palinski W, Silverman G. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest*. 2000;105: 1731–1740.
42. Li W, Yuan XM, Ivanova S, Tracey KJ, Eaton JW, Brunk UT. 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischaemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin. *Biochem J*. 2003;371(2):429-436.
43. Hu RH, Pegg AE. Rapid induction of apoptosis by deregulated uptake of polyamine analogues. *The Biochemical Journal*. 1997;328(1):307-316.
44. Davydov VV, Bozhkov AI. Carbonyl stress is a nonspecific factor of pathogenesis. *Zhurnal NAMN Ukrayiny*. 2014;20(1):25-34.
45. Sukhova LL. Activity of endogenous aldehydes catabolism enzymes in subcellular fractions of liver, heart and brain of rats at pubertal age under stress. *Biomeditsinskaia khimiia*. 2012;58(6):691-701.
46. Barski OA, Tipparaju SM, and Bhatnagar A. The Aldo-Keto Reductase Superfamily and its Role in Drug Metabolism and Detoxification. *Drug. Metab. Rev*. 2008;40(4):553-624.
47. Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL et al. A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J*. 2003;22(16):4103–4110.

48. Pappa A, Estey T, Manzer R, Brown D, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *The Biochemical Journal*. 2003;376(3):615-623.
49. Kaushik MD, Tuanjie C, Hui W, et.al. Oxidative stress and aging: Is methylglyoxal the hidden enemy? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2010;88(3):273–284.
50. Singh R, Barben F, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-146.
51. Baynes JW. From life to death - the struggle between chemistry and biology during aging: the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage. *Biogerontology*. 2000;1(3):235–246.
52. Mostafa AA, Randell EW, Vasdev SC, et al. Plasma protein advanced glycation end products, carboxymethyl cysteine, and carboxyethyl cysteine, are elevated and related to nephropathy in patients with diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 2007;302(1-2):35-42.
53. Shaikh S, Nicholson LF. Advanced glycation end products induce in vitro cross-linking of alpha-synuclein and accelerate the process of intracellular inclusion body formation. *J Neurosci Res*. 2008;86(9):2071-2082.
54. Fuentealba D, Friguet B, Silva E. Advanced Glycation Endproducts Induce Photocrosslinking and Oxidation of Bovine Lens Proteins Through Type-I Mechanism. *Photochem Photobiol*. 2009;85(1):185-194.
55. Krautwald M, Münch G. Advanced glycation end products as biomarkers and gerontotoxins - A basis to explore methylglyoxal-lowering agents for Alzheimer's disease? *Experimental Gerontology*. 2010;45(10):744-751.
56. Schmitt A, Schmitt J, Münch G, Gasic-Milencovic J. Characterization of advanced glycation end products: mass changes in correlation to side chain modifications. *Anal. Biochem*. 2005;338(2):201-215.

57. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. Advanced Glycation End Products. *Circulation*. 2006;114(6):597–605.
58. Grimsrud PA, Hongwei X, Griffin TJ, Bernlohr DA. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *J Biol. Chem*. 2008;283(32):21837–21841.
59. Curtis T. The role lipid aldehydes and ALEs in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;75(1):8.
60. Li W, Gao H, Mu H, Chen H, Fang X, Zhou Y, Fei Tao. Three different active aldehydes induce the production of advanced lipoxidation end products upon incubation with bovine serum albumin. *Europ. J of Lipid Scien. and Techn*. 2015;17(9):1432-1443.
61. Kuhla B, Luth HJ, Haferburg, D, et.al. Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2005;1043(1):211–216.
62. Glenn J, Stitt A. The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009;1790(10):1109–1116.
63. Kalousova M, Zima T, Tesar V, et.al. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Patients With Decreased Renal Function. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005;579(1–2):37-46.
64. Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Mel'nikova TI, Porozov YB, Terentiev AA. Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;3:1-14.
65. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen X, Pyzik R, Yong A, Striker GE, Vlassara H. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc*. 2010; 110:911–912.

66. Chen JH, Lin X, Bu C, Zhang X. Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies. *Nutrition & Metabolism*. 2008;15:72.
67. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycooxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013;47(1):3–27.
68. Erbersdobler HF, Somoza V. Forty years of furosine - forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51:423–430.
69. Goldberg T, Cai W, Peppas M, Dardaine V, Baliga BS, Uribarri J, Vlassara H. Advanced glycooxidation end products in commonly consumed foods. *J Am Diet Assoc*. 2004;104:1287–1291.
70. Chao PC, Huang CN, Hsu CC, Yin MC, Guo YR. Association of dietary AGEs with circulating AGEs, glycated LDL, IL-1alpha and MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Eur J Nutr*. 2010;49:429–434.
71. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014;18(1):14.
72. Simm A. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *J Proteome*. 2013;92:248–259.
73. Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S. Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: a novel therapeutic strategy. *Curr Drug Targets*. 2010;11:1468–1482.
74. Wang Z, Jiang Y, Liu N, Ren L, Zhu Y, An Y, Chen D. Advanced glycation end-product N-ε-carboxymethyl-lysine accelerates progression of atherosclerotic calcification in diabetes. *Atherosclerosis*. 2012;221:387–396.
75. Liu SH, Sheu WH, Lee MR, Lee WJ, Yi YC, Yang TJ, Jen JF, Pan HC, Shen CC, Chen WB, et al. Advanced glycation end product N-ε-

- carboxymethyllysine induces endothelial cell injury: the involvement of SHP-1-regulated VEGFR-2 dephosphorylation. *J Pathol.* 2013;230:215–227.
76. Tanaka S, Avigad G, Eikenberry EF, Brodsky B. Isolation and partial characterization of collagen chains dimerized by sugar-derived cross-links. *J Biol Chem.* 1988;263:17650–17657.
77. Charonis AS, Reger LA, Dege JE, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Wohlhueter RM, Tsilibary EC. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes.* 1990;39:807–814.
78. Forbes JM, Soldatos G, Thomas MC. Below the radar: advanced glycation end products that detour “around the side”: is HbA(1c) not an accurate enough predictor of long term progression and glycaemic control in diabetes? *Clin Biochem Rev.* 2005;26:123–134.
79. Avery NC, Bailey AJ. The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathologie-biologie.* 2006;54:387–395.
80. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:645–659.
81. Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone.* 2002;31:1–7.
82. Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int.* 2006;17:1514–1523.
83. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, MacLellan CM, Raptis M, Liu R, Pischon N, Trackman PC, Gerstenfeld L, Graves DT. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone.* 2007;40:345–353.

84. Sanguineti R, Storace D, Monacelli F, Federici A, Odetti P. Pentosidine effects on human osteoblasts in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1126:166–172.
85. Colzani M, Maddis DD, Casali G, Carini M, Vistoli G, Aldini G. Reactivity, Selectivity, and Reaction Mechanisms of Aminoguanidine, Hydralazine, Pyridoxamine, and Carnosine as Sequestering Agents of Reactive Carbonyl Species: A Comparative Study. *Chem Med Chem.* 2016;11(16):1778-1789
86. Chowdhury P, Michael E, Soulsby ME, Scott JL. Effects of Aminoguanidine on Tissue Oxidative Stress Induced by Hindlimb Unloading in Rats. *Annals of Clinical & Laboratory Science.* 2009;39(1):64-71
87. Дмитренко М. П., Шандренко С. Г., Петрунь Л. М., Кішко Т. О., Силонова Н. В., Латишко Н. В., Гудкова О. О., Сушкова В. В. Обмін формальдегіду за семікарбазидної інтоксикації. *Укр. Біохім. Журн.* 2010;82(4):86-91.
88. Kool ET, Park DH, Crisalli P. Fast hydrazone reactants: electronic and acid/base effects strongly influence rate at biological pH. *J Am Chem Soc.* 2013;135(47):17663-17666.
89. Токарчук К.О., Крисюк І.П., Капустяненко Л.Г., Шандренко С.Г. Роль альдегідів у розвитку оксидативного стресу в щурів із гліцерол-стимульованим рабдоміолізмом і стрептозотоцин-індукованим діабетом. *Біол. Студії.* 2014;8(1):73-84.
90. Dzib-Guerra WC, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Derbré S, Blanchard P, Richomme P, Peña-Rodríguez LM. Anti-Advanced Glycation End-product and Free Radical Scavenging Activity of Plants from the Yucatecan Flora. *Pharmacognosy Res.* 2016;8(4):276–280.
91. Hatanaka A, Sekiya L, Kajiwara T, Munechika K. Natural Inhibitor for Volatile C6-Aldehyde Formation from Cis-Unsaturated Fatty Acids. *Agric. Biol. Chem.* 1982;46(11):2705-2710.

92. Meng Y, Han S, Gu Z, Wu J. Cysteine-Based Biomaterials as Drug Nanocarriers. *Advanced Therapeutics*. 2020;3(5):1900142.
93. Zhitkovich A. N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. *Chem. Res. Toxicol.* 2019;32(7):1318–1319.
94. Zhang J, Chan CK, Ham YH, Chan W. Identifying Cysteine, N-Acetylcysteine, and Glutathione Conjugates as Novel Metabolites of Aristolochic Acid I: Emergence of a New Detoxification Pathway. *Chemical Research in Toxicology*. 2020;33(6):1374-1381.
95. Ansari NA, Moinuddin, Ali R. Glycated lysine residues: a marker for non-enzymatic protein glycation in age-related diseases. *Disease Markers*. 2011;30(6): 317–324.
96. Trézl L, Hullán L, J'szay ZM, Szarvas T, Petneházy I, Szende B, Bocsi J. Antagonistic reactions of arginine and lysine against formaldehyde and their relation to cell proliferation, apoptosis, folate cycle and photosynthesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003;244:167–176.
97. Trézl L, Rusznák I, Tyihák E, Szarvas T, Szende B. Spontaneous N^ε-methylation and N^ε-formylation reactions between L-lysine and formaldehyde inhibited by L-ascorbic acid. *Biochem J*. 1983;214:289-292.
98. Cheng J, Wang F, Yu DF, Wu PF, Chen JG. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine *via* protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *European Journal of Pharmacology*. 2011;650(1):184-194
99. Katare RG, Caporali A, Oikawa A, Meloni M, Emanuelli C, Madeddu P. Vitamin B1 analog benfotiamine prevents diabetes-induced diastolic dysfunction and heart failure through Akt/Pim-1-mediated survival pathway. *Circ Heart Fail*. 2010;3(2):294-305.
100. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine. *Pharmacol Res*. 2010;61(6):482-488.

101. Suzuki K, Nakagawa K, Miyazawa T. Augmentation of blood lipid glycation and lipid oxidation in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(1):47-52.
102. Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E, Kitsanta P, Fotsis T, Papapetropoulos A, Roussos C. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(6):818-823.
103. Chowanadisai W, Bauerly KA, Rucker RB. Pyrroloquinoline Quinone Stimulates Mitochondrial Biogenesis through cAMP Response Element-binding Protein Phosphorylation and Increased PGC-1 α Expression. *J Biol Chem.* 2010;285(1):142-152.
104. Chou CT, Lin HT, Hwang PA, Wang ST, Hsieh CH, Hwang DF. Taurine resumed neuronal differentiation in arsenite-treated N2a cells through reducing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction. *Amino Acids.* 2015;47(4):735-744.
105. Bosch X, Poch E, Grau JM. Rhabdomyolysis and acute kidney injury. *N Engl J Med.* 2009;361(1):62.
106. Giannoglou GD, Chatzizisis YS, Misirli G. The syndrome of rhabdomyolysis: Pathophysiology and diagnosis. *Eur J Intern Med.* 2007;18(2):90.
107. Weibrecht K, Dayno M, Darling C, Bird SB. Liver aminotransferases are elevated with rhabdomyolysis in the absence of significant liver injury. *J Med Toxicol.* 2010;6(3):294.
108. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *Eur Heart J.* 2013;34(31):2444-2452.
109. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes.* 2005;54(6):1615-1625.

110. Conget I. Diagnosis, classification and pathogenesis of diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*. 2002;55(5):528-538.
111. Jaganjac M, Tirosh O, Cohen G, Sasson S, Zarkovic N. Reactive aldehydes – second messengers of free radicals in diabetes mellitus. *Free Radical Research*. 2013;47(1):39-48.
112. Knott HM, Brown BE, Davies MJ, Dean RT. Glycation and glycooxidation of low-density lipoproteins by glucose and low-molecular mass aldehydes. Formation of modified and oxidized particles. *Eur J Biochem*. 2003; 270(17):3572-3582.
113. Pastor-Belda M, Fernández-García AJ, Campillo N, Pérez-Cárceles MD, Motas M, Hernández-Córdoba M, Viñas P. Glyoxal and methylglyoxal as urinary markers of diabetes. Determination using a dispersive liquid-liquid microextraction procedure combined with gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2017;1509:43-49.
114. Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Obberghen EV. Methylglyoxal Impairs the Insulin Signaling Pathways Independently of the Formation of Intracellular Reactive Oxygen Species. *Diabetes*. 2006;55(5):1289-1299.
115. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II *Eur Heart J*. 2013;34(31):2444-52.
116. Staniszewska MM. Upregulation of glyoxalase I fails to normalize methylglyoxal levels: a possible mechanism for biochemical changes in diabetic mouse lenses. *Mol. Cell. Biochem*. 2006;288:29–36.
117. Martin AA, Pereira L, Ali SM, Pizzol CD, Tellez CA, Favero PP, Santos L, Silva VVD, Praes CEO. Detection of advanced glycation end products (AGEs) on human skin by in vivo confocal Raman spectroscopy. *Biomedical Vibrational Spectroscopy*. 2016; 9704:97040.

118. Waateringe RP, Fokkens BT, Slagter SN, Klauw MM, Vliet-Ostapchouk JV, Graaff R, Paterson AD, Smit AJ, Lutgers HL, Wolffenbuttel BHR. Skin autofluorescence predicts incident type 2 diabetes, cardiovascular disease and mortality in the general population. *Diabetologia*. 2019;62:269–280.
119. Abe M, Takahashi M, Horiuchi K, Nagano A. The changes in crosslink contents in tissues after formalin fixation. *Anal Biochem*. 2003; 318(1):118-123.
120. Barrow MV, Simpson CF, Miller EJ. Lathyrism: A Review. *Q Rev Biol*. 1974;49:101-128.
121. Rouby DH, Bashir MH, Korany NS. Ultrastructural and histomorphometric alterations of rat jaw bones after experimental induction of lathyrism. *Arch Oral Biol*. 2008;53(10):916-923.
122. Kusama-Eguchi K, Ikegami F, Kusama T, Suda A, Ogawa Y, Igarashi K, Watanabe K. A rat model of neurolathyrism: repeated injection of beta-ODAP induces the paraparesis of the hind legs. *Amino Acids*. 2005;28(2):139-143.
123. Bondareva A, Downey CM, Ayres F, Liu W, Boyd SK, Hallgrimsson B, Jirik FR. The Lysyl Oxidase Inhibitor, beta-Aminopropionitrile, Diminishes the Metastatic Colonization Potential of Circulating Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2009;4(5):e5620.
124. Li W, Liu G, Chou IN, Kagan HM. Hydrogen peroxide-mediated, lysyl oxidase-dependent chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem*. 2000;78:550–557.
125. Giampuzzi M, Oleggini R, Di Donato A. Altered adhesion features and signal transduction in NRK-49F cells transformed by down-regulation of lysyl oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1647:239–244.

126. Sormunen R, Maki JM, Lippo S, Kaarteenaho-Wiik R, Soininen R, Myllyharju J. Lysyl Oxidase Is Essential for Normal Development and Function of the Respiratory System and for the Integrity of Elastic and Collagen Fibers in Various Tissues. *American Journal of Pathology*. 2005;167(4):927-936.
127. Maki JM. Lysyl oxidases in mammalian development and certain pathological conditions. *Histol Histopathol*. 2009;24(5):651-660.
128. Erler JT, Bennewith KL, Nicolau M, Dornhofer N, Kong C, et al. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*. 2006;440:1222-1226.
129. Maranghi F, Tassinari R, Lagatta V. Effects of the food contaminant semicarbazide following oral administration in juvenile Sprague-Dawley rats. *Food and Chem.Tox*. 2009;47:472-479.
130. Palamakumbura AH, Trackman PC. A Fluorometric assay for detection of lysyl oxidase enzyme activity in biological samples. *Anal. Biochem*. 2002;300:245–251.
131. Spencer VA , Davie JR. Isolation of Proteins Cross-linked to DNA by Formaldehyde.The protein Protocols Handbook. 2002;1: 753-757.
132. Orlando, V. Mapping chromosomal proteins by in vivo formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci*. 2000;25:99–104.
133. Wozniak MA, Keely PJ. Use of three-dimensional collagen gels to study mechanotransduction in T47D breast epithelial cells. *Biol. Proced. Online*. 2005;7(1):144-161.
134. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;70:1-32.

135. Wu L, Zhu Y. The function and mechanisms of action of LOXL₂ in cancer
Int J Mol Med. 2015;36(5):1200-1204.
136. Cox TR, Rumney RMH, Erler JT. The hypoxic cancer secretome induces
pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature.* 2015;522:106–
110.
137. Postovit LM, Abbott DE, Payne SL, Wheaton WW, Margaryan V.
Hypoxia/reoxygenation: a dynamic regulator of lysyl oxidase-facilitated
breast cancer migration. *J Cell Biochem.*2008;103:1369–1378.
138. Toninello A, Pietrangeli P, Marchi UD, Salvi M, Mondovi B. Amine
oxidases in apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1765 (1):1-13.
139. Agostelli E, Arancia G, Vedova LD, Belli F, Marra M, Salvi M, Toninello
A. The biological functions of polyamine oxidation products by amine
oxidases: perspectives of clinical applications. *Amino Acids.* 2004;27(3-
4):347-358.
140. Garpenstrand H, Bergqvist M, Brattström D, Larsson A, Orelund L,
Hesselius P, Wagenius G. Serum semicarbazide-sensitive amine oxidase
(SSAO) activity correlates with VEGF in non-small-cell lung cancer
patients. *Med Oncol.* 2004;21(3):241-245.
141. Lamaze C, Torrino S. Caveolae and Cancer: A New Mechanical Perspective.
Biomed J. 2015;38(5):367-379.
142. Tong Z, Luo W, Wang Y, Yang F, Han Y, et al. Tumor Tissue-Derived
Formaldehyde and Acidic Microenvironment Synergistically Induce Bone
Cancer Pain. *PLoS ONE.* 2010;5(4):e10234.
143. Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. *J.Cell.Mol.Med.*
2003;7(2):113-126.
144. Medina VA, Rivera ES. Histamine receptors and cancer pharmacology. *Br J
Pharmacol.* 2010;161(4):755–767.

145. Prasad S, Gupta SC, Pandey MK, Tyagi AK, Deb L. Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:5010423.
146. Wang Z, Li S, Cao Y, Tian X, Zeng R, Liao DF, Cao D. Oxidative Stress and Carbonyl Lesions in Ulcerative Colitis and Associated Colorectal Cancer. *Hindawi Publishing Corporation, Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016;2016:9875298.
147. Vanholder R, Sever MS, Ereğ E, Lomeire N. Rhabdomyolysis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;11:1553-1561.
148. Шандренко С.Г. Утворення пулу лабільного заліза в крові при рабдоміолізі у щурів. *Укр. Біохім. Журнал*. 2012;84(6):124-130.
149. Barr I, Guo F. Pyridine Hemochromagen Assay for Determining the Concentration of Heme in Purified Protein Solutions. *Bio Protoc.* 2015;5(18):e1594
150. Пат. 2400822 Росія, МПК G 09 B23/28. Спосіб моделювання сахарного діабета I типу у крыс / Закирьянов А.Р., Великий Д.А., Онищенко Н.А., Клименко Е.Д., Поздняков О.М.. Опубл. 27.09.2010, Бюл. № 27.
151. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С. Науково-методичні рекомендації з утримання лабораторних тварин. К.: Авіцена. 2002. 156 с.
152. Lee CH. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: Measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core bt periodate oxidation. *Analytical Biochemistry*. 1999;267:161-168.
153. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994;233:380–385.

154. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.* 1990;9(6):515-540.
155. Peterson GL. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Anal. Biochem.* 1977;83:346-356.
156. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.
157. Gudkova OO, Latyshko NV, Zaitseva OV, Shandrenko SG. Purification procedure and assay for the activity of lysyl oxidase. *Ukr. Biochem. J.* 2018;90(5):98-105.
158. Gudkova OO, Latyshko NV, Shandrenko SG. Amine oxidases as important agents of pathological processes of rhabdomyolysis in rats. *Ukr. Biochem. J.* 2016;88:79-87.
159. Anderson RF. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase as a possible marker for hypoxia in tumours and normal tissues. *J. Cancer.* 1989;60(2):193-197
160. Goodman JJ, Tephly TR. A comparison of rat and human liver formaldehyde dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1971;252(3):489-505.
161. Зайцева О.В, Шандренко С.Г. Модифікація спектрофотометричного методу визначення карбонільних груп протеїнів. *Укр.біохім.журн.* 2012;84(5):112-116.
162. Шандренко С. Г., Кішко Т. О., Чумаченко І. М., Дмитренко М. П. Зміни в обміні оксиду азоту та заліза у щурів, спричинені азбестом. *Укр.біохім.журн.* 2011;83(2):93-100.
163. Каплінський В. В. До методики визначення білкових макромолекул організму тварин у поліакриламідному гелі. Науково-технічний

- бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветпрепаратів та кормових добавок. 2014;15(2-3):282-286.
164. Володіна Т.Т., Дзвонкевич Н.Д., Петрунь Л.М., Крисюк І.П., Попова Н.М., Шандренко С.Г., Дмитренко М.П. Зміна властивостей колагену, активності лізилоксидази при латиризмі. *Фізіол. журн.* 2011;50(3):62-68.
165. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by asid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-159.
166. Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statistical methods in biomedical studies using Excel. К.: Morion, 2000. 320 p. (In Russian).
167. Крисюк І.П., Кнауб А.Я. Порівняльне дослідження глікування L – лізину *in vitro* деякими альдегідами ендогенного походження. / Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 5-8 квітня. Львів, 2011. С. 215.
168. Крисюк І.П., Кнауб А.Я., Шандренко С.Г. Порівняння модифікуючої дії біоактивних альдегідів на альбумін людини. *Укр. біохім. журн.* 2014;86(2):68-78.
169. Hanssen NMJ, Engelen L, Ferreira I et al. Plasma levels of advanced glycation endproducts Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, Nepsilon-(carboxyethyl)lysine, and pentosidine are not independently associated with cardiovascular disease in individuals with or without type 2 diabetes: the Hoorn and CODAM studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2013;98(8):E1369–E1373.
170. Крисюк І.П., Дзвонкевич Н.Д., Володіна Т.Т., Попова Н.Н., Шандренко С.Г. Вплив біоактивних альдегідів на желатину. *Укр. біохім. журн.* 2015;87(2):80-88.

171. Tokarchuk K, Krysyuk I, Shandrenko S. Changes of Carbonyl Stress Parameters in Rats with Diabetes and Rhabdomyolysis. *International Journal of Biochemistry Research & Review*. 2015;6(4):151-159.
172. Hoenicke K, Gatermann R, Hartig L, Mandix M, Otte S. Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment: is SEM a specific marker for nitrofurazone abuse? *Food Additives and Contaminants*. 2004;21(6):526–537.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Володіна Т.Т., Дзвонкевич Н.Д., Петрунь Л.М., **Крисюк І.П.**, Попова Н.М., Шандренко С.Г., Дмитренко М.П. Зміни властивостей колагену, активності лізилоксидази при латиризмі. *Фізіологічний журн.* 2011;**57**(3):62-68.
2. Токарчук К.О., **Крисюк І.П.**, Капустяненко Л.Г., Шандренко С.Г. Роль альдегідів у розвитку оксидативного стресу в щурів з гліцерол-стимульованим рабдоміолізом і стрептозотоцин-індукованим діабетом. *Біологічні студії/Studia Biologica.* 2014;**8**(1):73-84.
3. **Крисюк І.П.**, Кнауб А.Я., Шандренко С.Г. Порівняння модифікуючої дії біоактивних альдегідів на альбумін людини. *Укр. біохім. журн.* 2014;**86**(2):68-78.
4. **Крисюк І.П.**, Дзвонкевич Н.Д., Володіна Т.Т., Попова Н.Н., Шандренко С.Г. Вплив біоактивних альдегідів на желатину. *Укр. біохім. журн.* 2015;**87**(2):80-88.
5. Tokarchuk K., **Krysyuk I.**, Shandrenko S. Changes of Carbonyl Stress Parameters in Rats with Diabetes and Rhabdomyolysis. *International Journal of Biochemistry Research & Review.* 2015;6(4):151-159.

Патенти

1. Пат. на корисну модель 93589 UA, МПК C07C 45/75 (2006.01). Спосіб кількісного визначення формальдегіду в організмі тварин при умовах, наближених до *in vivo*. / Шандренко С.Г., **Крисюк І.П.**, Токарчук К.О., Савчук М.М. Опубл. 10.10.2014, Бюл. №19.
2. Пат. на корисну модель 125508 UA, МПК C07D 401/02 (2006.01). Комплексна дієтична добавка при гіперкарбонільному стані. Шандренко С.Г., **Крисюк І.П.**, Володіна Т.Т. Опубл. 10.05.2018, Бюл. №9.

3. Пат. на корисну модель 129572 UA, МПК (2018.01) А61К 31/00. Добавка дієтична для застосування при онкологічних захворюваннях. Шандренко С.Г., **Крисюк І.П.** Опубл. 12.11.2018, Бюл. №21.

Апробація матеріалів дисертації:

1. Шандренко С.Г., Володіна Т.Т., Дзвонкевич Н.Д., Петрунь Л.М., **Крисюк І.П.**, Попова Н.М., Дмитренко М.П. Зміни активності лізілоксидази та вмісту формальдегіду у разі семікарбозид-індукованого латиризму. / Мат. Х Українського біохімічного з'їзду 13-17 вересня 2010 р. Одеса. 2010. **82**(4;2) С. 194.

2. **Крисюк І.П.**, Кнауб А.Я. Порівняльне дослідження глікування L – лізину *in vitro* деякими альдегідами ендogenous походження. / Матеріали VII Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 5-8 квітня. Львів. 2011. С. 215.

3. **Крисюк І.П.**, Кнауб А.Я., Дмитренко Н. П. О возможностях использования флуорескамина при изучении взаимодействия некоторых альдегидов ендogenous происхождения с L – лизином в опытах *in vitro*. / Матеріали V Всеукраїнської конференції «Хімічні проблеми сьогодення», 14-17 березня. Донецьк. 2011. С. 56-57.

4. **Крисюк І.П.**, Кнауб А.Я., Шандренко С.Г. Порівняльне дослідження модифікації альбуміну деякими альдегідами *in vitro*. / Мат. VIII Міжнародної науково-технічної конференції. “Актуальні питання біологічної фізики та хімії” 23-27 квітня. Севастополь. 2012. С.239.

5. Дзвонкевич Н.Д., **Крисюк І.П.**, Володіна Т.Т., Попова Н. М., Шандренко С.Г. Порівняльні дослідження дії ряду альдегідів на препарати колагену *in vitro*. БФФХ-2012. / Матеріали VIII Міжнародної науково-технічної конференції. Севастополь. 2012. С. 251-252.

6. Tokarchuk K.O., Zaitseva O.V., **Krysiuk I.P.**, Shandrenko S.G. Participation of aldehydes in oxidative stress parameters development under rhabdomyolysis and streptozotocin-induced diabetes rat's models. / VIII Всеукраїнська научна конференція студентів, аспірантів і молодих учених с міжнародним участієм “Хімічні проблеми сучасності”, Донецьк. 2014. С. 160.

7. Tokarchuk KO, Zaitseva OV, **Krysiuk IP**, Shandrenko SG. The peculiarities of carbonyl stress development in rats under conditions of diabetes and diabetes, complicated with rhabdomyolysis. / Матеріали XII Українського біохімічного Конгресу м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. *Медична та клінічна хімія*. 2019. **21**(3) (додаток), С.142.

8. Horak I, Gudkova O, LatyshkoN, Kishko T, Khudiakova O, Volodina T, Popova N, Skaterna T, **Krysiuk I**, Shandrenko S, Drobot L. Ruk/CIN85-overexpressing murine breast adenocarcinoma 4T1 cells possess properties of amoeboid mode of migration/invasion. / Матеріали XII Українського біохімічного Конгресу м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 р. *Медична та клінічна хімія*. 2019. **21**(3) (додаток), С.77.