

АНОТАЦІЯ

Гудкова О.О. Залучення амінооксидаз до розвитку патологічних станів нирки та легені. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія». – Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, 2023.

З-поміж великої кількості метаболічних шляхів, в яких генеруються активні форми кисню (АФК) та реактивні карбонільні сполуки (РКС), особливе місце займають реакції за участі ензимів амінооксидаз (АОаз), які каталізують окисне дезамінування біогенних амінів та поліамінів з утворенням пероксиду водню, відповідного до субстрату альдегіду та амонію. Сучасні експериментальні дослідження переконливо засвідчили, що за патологічних умов рівні біогенних амінів та поліамінів в організмі людини і тварин багаторазово зростають. Тому причетність АОаз до патогенезу великої низки захворювань інтенсивно вивчається, а рівень активності окремих ензимів використовують як клінічні маркери. Водночас, на сьогодні в літературі відсутня інформація щодо комплексного вивчення ролі АОаз у прогресуванні захворювань нирки та легені. Сказане зумовило постановку мети дисертаційної роботи - дослідити залучення FAD-вмісної поліамінооксидази (РАО) та Cu-вмісних протеїнів, діамінооксидази (DAO), розчинної і мембранозв'язаної форм семікарбазидчутливої амінооксидази (SSAO), позаклітинної лізилоксидази (LOX) до розвитку патологічних станів нирки та легені, а також потенційний вплив семікарбазиду (SC), інгібітора Cu-АОаз, на прояви захворювань.

В роботі використано наступні методи: моделювання гострих та хронічних захворювань нирки та легені у лабораторних тварин (гліцерол-індукованого рабдоміолізу, стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 1 типу та Блеоміцин С(BLM)-індукованого фіброзу легені у щурів, овальбумін(OVA)-індукованої бронхіальної астми у мурчаків), клітинної та молекулярної біології (модель високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс з пригніченням рівня експресії адапторного протеїну Ruk/CIN85), Вестерн-блот аналіз, препаративної біохімії та диференційного центрифугування, спектрофотометрія, спектрофлуориметрія,

цитофлуорометрія, імуноензимний аналіз, ЕПР-спектроскопія, світлова мікроскопія, гістологічні та морфометричні дослідження, статистичний аналіз.

За моделювання гліцерол-індукованого рабдоміолізу у щурів розвивається гостра ниркова недостатність, при цьому в нирці та тимусі тварин спостерігались зміни активностей всіх досліджуваних АОаз та антиоксидантних ензимів, каталази (CAT) та супероксиддисмутази (SOD), відносно контрольної групи. Динаміка та скерованість змін активності SSAO в обох тканинах виявились однаковими, і, починаючи з 3 дня розвитку патології, цей показник зростав у 2 і 3 рази, відповідно. Активності DAO та PAO, що беруть участь у катаболізмі поліамінів, протягом розвитку патології у нирці осцилювали, і на 3-ий день активність DAO зростала майже у 2 рази, тоді як активність PAO зростала на 6-ий день в 1,6 раза відносно контрольної групи. Таким чином, за умов індукованої гліцеролом гострої ниркової недостатності багаторазове зростання активностей досліджених АОаз та антиоксидантних ензимів в нирці та тимусі відповідає ступеню важкості перебігу захворювання.

Для підтвердження залучення АОаз до розвитку ниркової патології за умов стрептозотоцин-індукованого діабету 1 типу було сформовано 3 експериментальні групи: Контроль, Діабет, Діабет+Рабдоміоліз (щури з розвиненим діабетом, яким індукували рабдоміоліз). Механістичне комбінування двох моделей здійснювали для з'ясування внеску потужності оксидативного стресу до розвитку діабетичної хвороби нирки, очікуючи отримати адитивний ефект на біохімічні показники в нирковій тканині. Активність SSAO в нирці та крові щурів з діабетом у порівнянні з контролем зростала у 3 та 1,5 рази, відповідно, тоді як ускладнення рабдоміолізом, призводило до зниження/нормалізації цього показника в нирці та печінці. Крім того зростання вмісту вільних радикалів в крові тварин Діабет+Рабдоміоліз порівняно з контролем та діабетом, корелювало з зростанням вмісту вільного Fe^{3+} (у 15 разів відносно групи Діабет). При цьому активність про- та антиоксидантних ензимів в тканинах щурів зазнавала змін лише за діабетичного стану. Було продемонстровано появу в крові діабетичних щурів комплексу Hb-NO, збільшення відносно контролю у 2 рази вмісту метгемоглобіну та у 1,8 раза вмісту 3-нітротирозину протеїнів

плазми крові, а також у 15 разів динітрозильних комплексів заліза (ДНКЗ) в печінці. Індукування рабдоміолізу у тварин з діабетом призводило до збільшення у 1,5 раза лише зв'язаних форм NO у вигляді Hb-NO в крові та ДНКЗ в печінці. При цьому рівень нітрування тирозинових залишків протеїнів крові знижувався до рівня норми. Зроблено припущення про існування регуляторного взаємозв'язку між окисним дезамінуванням біогенних амінів за участі АОаз та метаболізмом активних форм азоту (АФА). Отримані дані свідчать про багаторазове підвищення рівня активності SSAO в нирці та крові за умов моделювання цукрового діабету 1 типу у щурів, яке позитивно корелювало зі ступенем оксидативно/карбонільного та нітрозативного стресу, насамперед, рівнем вільного NO.

Оскільки Cu-АОази є чутливими до семікарбазиду (SC), ми вирішили використати дану сполуку в корегувальних цілях та за його допомогою довести залучення досліджуваних ензимів до деструктивних порушень в тканинах організму. Враховуючи суттєві обмеження використання SC в клініці, необхідно було з'ясувати механізми його біотрансформації та ідентифікувати утворені продукти як потенційні чинники токсичного впливу на організм. Було зроблено припущення про участь родини цитохромів P-450 в біотрансформації SC, що було продемонстровано методом диференційної спектрофотометрії. Зміни в диференційних спектрах мікросомної фракції печінки щурів, яка містила цитохром P-450, свідчили про утворення активного інтермедіату каталітичного циклу з подальшим утворенням продуктів реакції за присутності SC в межах концентрацій 1,5-7,5 мМ. Таким чином, концентрація SC до 1,5 мМ може вважатися безпечною і це враховувалось на подальших етапах роботи. Згідно запропонованого механізму, розкладання SC цитохромами P-450 проходить в 2 етапи з утворенням формальдегіду, оксиду азоту та аміаку. Утворення формальдегіду та NO було підтверджено використанням відповідних пасток.

На моделі овальбумін-індукованої бронхіальної астми (БА) у мурчаків, було досліджено участь Cu-АОаз у патогенезі даного захворювання шляхом пригнічення їх активностей застосуванням SC в обраних дозах, як шляхом перорального споживання з водою (0,05%, SC1), так і шляхом вдихання аерозолу (0,2%, SC2). В

досліді було сформовано 6 експериментальних груп: Контроль, Бронхіальна астма (БА), БА+SC1, БА+SC2 та 2 групи негативного контролю, сенсibilізовані тварини без провокацій овалбуміном та несенсibilізовані, але провоковані алергеном. Розвиток реакції гіперчутливості I типу (атопічна БА) оцінювали за вмістом в крові та легеневій тканині цитокінів IL-4 та IL-13, які регулюють відповідно початкову та ефекторну стадії алергічної реакції. У тварин з БА спостерігалось достовірне збільшення вмісту IL-13 в легені (майже у 2 рази). Вживання SC тваринами обох груп з БА не призводило до змін цього показника. Результати гістологічного та морфометричного досліджень зразків легені продемонстрували наявність у тварин з БА деструктивних змін тканини з основними ознаками запального процесу, а саме зниження повітряності легені та присутністю осередків інфільтрації й пневмосклерозу в порівнянні з контролем. У групах тварин БА+SC1 та БА+SC2 також спостерігались всі ознаки патології, але вони були менш виражені та локально обмежені. Оксидативно/нітрозативний стрес у хворих тварин характеризували за сумарним вмістом вільних радикалів в легеневій тканині, який був збільшений у 2,6 рази у порівнянні з контрольною групою, експресією протеїну індукцiбельної NO-синтази що зростала ~ у 2 рази в легені та рівнем продукування NO клітинами, інфільтрованими в дихальні шляхи. Прийом тваринами SC як з питною водою, так і у вигляді аерозолі, призводив до суттєвого зниження лише вмісту вільних радикалів в легені. У мурчаків з БА спостерігалось суттєве зростання у 1,5-2 рази активностей LOX в легені, а також SSAO та DAO в плазмі крові, прийнятого клінічного показника даної патології. Введення SC тваринам за обома режимами супроводжувалось зниженням активності ензимів до рівня норми. Навпаки, активність DAO/гістамінази в змивах з епітелію бронхів тварин з БА багаторазово пригнічувалась (у 3 рази), хоча відомо, що за цих умов вміст гістаміну на 1-2 порядки перевищує фізіологічні значення. Це може свідчити про порушення процесу утилізації гістаміну в епітелії, що є однією з причин деструктивних змін в тканині. На фоні споживання SC відбувалось подальше зниження активності ензиму. Отже, ремоделювання дихальних шляхів за овалбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків супроводжується багаторазовим підвищенням в

легеневій тканині та крові тварин рівнів активностей Cu-АОаз, Споживання 0,05% семікарбазиду тваринами з бронхіальною астмою призводило до зменшення прояву ознак патології за рахунок інгібування досліджуваних ензимів.

За моделювання BLM-індукованого фіброзу легені у щурів було сформовано 4 експериментальні групи: Контроль, BLM (BLM вводили інтратрахеально 5 мг/кг ваги одноразово), BLM+SC (тварини, які одразу після індукування фіброзу легені протягом 3 тижнів споживали 0,005% розчин SC), Контроль+SC (інтактні тварини, які споживали розчин SC одночасно з групою BLM+SC). Розвиток ознак фіброзу легені у щурів підтверджено гістологічними та морфометричними дослідженнями. Споживання тваринами 0,005% SC стримувало появу патологічних змін в даній тканині. В легені щурів з індукованим фіброзом спостерігалось зростання рівнів активностей всіх досліджених АОаз у 1,5-2 рази відносно контролю. SC в підбраній дозі пригнічував активацію мідь-вмісних ензимів. Також, в легені тварин з фіброзом розвивався оксидативний стрес, не компенсований відповідною активацією антиоксидантної системи. Споживання тваринами SC стримувало розвиток ознак оксидативного стресу в легені та крові експериментальних тварин. Вміст цитохромів P-450 в печінці тварин групи Контроль+SC, не змінювався в порівнянні з контролем, що вказує на безпечність для організму застосованої кількості SC. Таким чином, на моделі BLM-індукованого фіброзу легені у щурів показано, що морфологічні ознаки розвитку патологічного стану органу-мішені супроводжуються підвищенням активностей всіх досліджених АОаз. Встановлено, що споживання хворими тваринами 0,005% SC (~1,0 мг/кг/добу) виявилось ефективним щодо послаблення ознак ремоделювання дихальних шляхів в результаті пригнічення активностей Cu-АОаз в легені тварин на 21-у добу після індукування патології.

Метаболічне перепрограмування ракових клітин є необхідним молекулярним підґрунтям для прогресії пухлинного росту, асоційованого з посиленням метастазування та хіміорезистентності. Раніше було продемонстровано, що підвищення рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у ракових клітин призводить до епітелійно-мезенхімного переходу (EMT) і розвитку ознак ракових стовбурових клітин (CSCs). Тому метою останнього етапу роботи було з'ясувати

взаємозв'язок між пригніченням експресії Ruk/CIN85 та метаболічним перепрограмуванням у клітинах карциноми легені Льюїс миші (LLC). Як модель було використано клітини LLC зі стабільним нокдауном Ruk/CIN85 (сублінія B1) та контрольні клітини (Scr). Активність лактатдегідрогенази (LDH) і вміст лактату, основних маркерів аеробного гліколізу в пухлинних клітинах, були знижені в B1 проти Scr у 2 і 1,5 рази відповідно. В клітинах B1 рівень H_2O_2 був у 1,5 раза нижчим, ніж у Scr, що корелювало зі зниженням активності SOD, як одного з джерел H_2O_2 у клітинах і зниженням активності CAT і глутатіонпероксидази (GPx) у 2,5 і 2 рази відповідно. Активність DAO в клітинах B1 знижувалась в 2 рази, що може бути пов'язано із зміною вмісту путресцину. Активності LOX і SSAO були знижені в 3 рази в клітинах LLC-B1 відносно Scr, що може бути пов'язано зі зниженням ступеня жорсткості позаклітинного матриксу, однієї з ознак злоякісності. Таким чином, зниження агресивності фенотипу в клітинах з down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 позитивно корелює зі ступенем вираженості ефекту Варбурга, профілем активностей досліджених АОаз, що підтверджує їх безпосередню причетність до контролю онкологічного процесу, загалом, та контролю стовбуровості й хіміорезистентності, зокрема.

Отримані в ході дисертаційного дослідження результати дають підстави для загального висновку: досліджені АОаз є джерелом оксидативного, карбонільного та нітрозативного стресу, що робить їх причетними до розвитку патологічних станів нирки та легені, тоді як рівні їх активностей відповідають ступеню перебігу захворювання; також ці показники є маркерами змін метаболізму АФА і зазнають впливу *in vivo* специфічного інгібітора, семікарбазиду, що може бути використано в розробці терапевтичних підходів у програмах комплексного лікування системних захворювань.

Ключові слова: амінооксидази, активні форми кисню, оксидативний стрес, активні форми азоту, оксид азоту, індукцибельна NO-синтаза, антиоксиданти, нефропатія, діабет 1 типу, запалення, фіброз легені, цитохром P-450, карцинома легені Льюїс, ракові клітини, цитотоксичність.