

**Національна академія наук України**

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Гудкова Ольга Олексіївна**

УДК: 577.151.63:577.121

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ЗАЛУЧЕННЯ АМІНООКСИДАЗ ДО РОЗВИТКУ ПАТОЛОГІЧНИХ  
СТАНІВ НИРКИ ТА ЛЕГЕНІ**

091 «Біологія»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

\_\_\_\_\_ Гудкова О.О.

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

**Київ - 2023**

## 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 (PAO) 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, спектрофлуорометрія, 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 органів-мішеней. 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-AOаз 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 аерозолі (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 овальбуміном 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 ефektorну 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 овальбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків супроводжується багаторазовим підвищенням в легеневої 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 підібраній 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 злякисності. 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, індукцйбельна NO-синтаза, антиоксиданти, нефропатія, діабет 1 типу, запалення, фіброз легені, цитохром P-450, карцинома легені Льюїс, ракові клітини, цитотоксичність.



## SUMMARY

*Hudkova O.O.* Involvement of amine oxidases in the development of kidney and lung pathology. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for applying for the Doctor of Philosophy degree in specialty 091 "Biology". – Palladin Institute of Biochemistry, NAS of Ukraine, Kyiv, 2023.

Among the large number of metabolic pathways in which reactive oxygen species (ROS) and reactive carbonyl species (RCS) are generated, a special place is occupied by reactions with the participation of amine oxidase enzymes (AOs), which catalyze the oxidative deamination of biogenic amines and polyamines with the formation of hydrogen peroxide, corresponding aldehyde and ammonium. Recent experimental studies have convincingly proven that under pathological conditions, the levels of biogenic amines and polyamines in human and animal bodies increase many times. Therefore, the involvement of AOs in the pathogenesis of a large number of diseases is intensively studied, and the level of activity of individual enzymes is used as clinical markers. At the same time, there is currently no information in the literature regarding a comprehensive study of the role of AOs in the progression of kidney and lung diseases. The foregoing led to the setting of the goal of the dissertation - to investigate the involvement of FAD-containing polyamine oxidase (PAO) and Cu-containing proteins, diamine oxidase (DAO), soluble and membrane-bound forms of semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO), extracellular lysyl oxidase (LOX) in the development of pathological conditions of the kidney and lungs, as well as the potential impact of semicarbazide (SC), a Cu-AOs inhibitor, on disease manifestations.

The following methods were used in the work: modeling of acute and chronic kidney and lung diseases in laboratory animals (glycerol-induced rhabdomyolysis, streptozotocin-induced type 1 diabetes and bleomycin C(BLM)-induced pulmonary fibrosis in rats, ovalbumin(OVA)-induced bronchial asthma in guineapigs), cellular and molecular biology methods (a model of highly invasive Lewis lung carcinoma cells with stable knockdown of the adaptor protein Ruk/CIN85), Western-blot analysis, preparative biochemistry as well as

differential centrifugation, spectrophotometry, spectrofluorometry, cytofluorometry, enzyme immunoassay, EPR spectroscopy, light microscopy, histological and morphometric studies, statistical analysis.

During simulation of glycerol-induced rhabdomyolysis in rats, acute renal failure develops, while changes in the activities of all investigated AOs and antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), were observed in the kidney and thymus of animals, relative to the control group. The dynamics and direction of SSAO activity changes in both tissues turned out to be the same, and starting from the 3rd day of pathology development, this indicator increased by 2 and 3 times, respectively. The activities of DAO and PAO, involved in the catabolism of polyamines, oscillated during the development of pathology in the kidney, and on the 3rd day, the activity of DAO increased almost 2 times, while the activity of PAO increased on the 6th day by 1.6 times relative to the control group. Thus, under the conditions of glycerol-induced acute renal failure, a multiple increase in the activities of the studied AOs and antioxidant enzymes in the kidney and thymus corresponds to the severity of the course of the disease.

To confirm the involvement of AOs in the development of renal pathology under the conditions of streptozotocin-induced type 1 diabetes, 3 experimental groups were formed: Control, Diabetes, Diabetes+Rhabdomyolysis (rats with developed diabetes that were induced with rhabdomyolysis). A mechanistic combination of the two models was carried out to elucidate the contribution of the strength of oxidative stress to the development of diabetic kidney disease, expecting to obtain an additive effect on biochemical parameters in renal tissue. The activity of SSAO in the kidney and blood of diabetic rats compared to the control increased by 3 and 1.5 times, respectively, while the complication of rhabdomyolysis led to a decrease/normalization of this indicator in the kidney and liver. In addition, the increase in the content of free radicals in the blood of Diabetes+Rhabdomyolysis animals compared to the control and diabetes correlated with the increase in the content of free  $\text{Fe}^{3+}$  (by 15 times compared to the Diabetes group). At the same time, the activity of pro- and antioxidant enzymes in the

tissues of rats underwent changes only in the diabetic state. The appearance of the Hb-NO complex in the blood of diabetic rats, a 2-fold increase relative to the control in the content of methemoglobin and a 1.8-fold increase in the content of 3-nitrotyrosine proteins in the blood plasma, as well as a 15-fold increase in dinitrosyl iron complexes (DNIC's) in the liver were demonstrated. In addition, the activity of pro- and antioxidant enzymes in the tissues of rats underwent changes only in the diabetic state, while the combination of diabetes with rhabdomyolysis did not cause significant changes in these parameters. At the same time, the degree of nitration of tyrosine residues of blood proteins decreased to the normal level. It is assumed that there is a regulatory relationship between the oxidative deamination of biogenic amines with the participation of AOs and the metabolism of active forms of nitrogen (RNS). The obtained data indicate multiple increases in the level of SSAO activity in the kidney and blood under the conditions of modeling diabetes type 1 in rats, which was positively correlated with the degree of oxidative/carbonyl and nitrosative stress, primarily, the level of free NO.

Since Cu-AOs are sensitive to semicarbazide (SC), we decided to use this compound for corrective purposes and use it to prove the involvement of the studied enzymes in destructive disorders in the tissues of the target organs. Given the significant limitations of using SC in the clinic, it was necessary to find out the mechanisms of its biotransformation and identify the formed products as potential factors of toxic effects on the body. An assumption was made about the participation of the P-450 family of cytochromes in the biotransformation of SC, which was demonstrated by the method of differential spectrophotometry. Changes in the differential spectra of the microsomal fraction of the rat liver, which contained cytochrome P-450, indicated the formation of an active intermediate of the catalytic cycle followed by the formation of reaction products in the presence of SC in concentrations of 1.5-7.5 mM. Hence, the concentration of SC up to 1.5 mM can be considered safe and this was taken into account in the subsequent stages of the work. According to the proposed mechanism, the decomposition of SC by P-450 cytochromes takes place in two stages with the formation of such

products as formaldehyde, nitrogen oxide, and ammonia. The formation of formaldehyde (FA) and NO was confirmed by using appropriate traps.

In the model of ovalbumin-induced bronchial asthma in guinea pigs, which is accompanied by chronic inflammation and remodeling of the airways, the involvement of Cu-AOs in the pathogenesis of this disease was investigated using SC in selected doses, by oral consumption with water (0.05%, SC1), as well as by inhaling an aerosol (0.2%, SC2). In the experiment, 6 experimental groups were formed: Control, Bronchial asthma (BA), BA+SC1, BA+SC2 and 2 groups of negative control, sensitized animals without provocation by ovalbumin and non-sensitized but provoked by allergen. The development of type I hypersensitivity reaction (atopic asthma) was assessed by the content of specific cytokines IL-4 and IL-13 in the blood and lung tissue, which are produced by type II T-helper cells and regulate, respectively, the initial and effector stages of the allergic reaction. In animals with BA, a significant increase in the content of IL-13 in the lungs (almost 2 times) was observed. Consumption of SC by animals of both groups with BA did not lead to changes in this indicator. The results of histological and morphometric studies of the lung samples of experimental animals demonstrated the presence of destructive changes in the lung tissue in animals with BA with the main signs of the inflammatory process, namely, a decrease in the airiness of the lungs, which is manifested in a decrease in the size of respiratory bronchioles and the presence of foci of infiltration and pneumosclerosis in comparison with the control group. All signs of pathology were observed in the BA+SC1 and BA+SC2 animal groups, but they were less pronounced and locally limited compared to the BA group. It is important to note that in several animals were found only foci of infiltration and much smaller manifestations of fibrosis. Oxidative/nitrosative stress in sick animals was characterized by the following markers: the total content of free radicals in the lung tissue, which was increased by 2.6 times compared to the control group, the expression of inducible NO-synthase protein in the lungs and the level of NO production by cells infiltrated into the respiratory tract increased by ~ 2 times. Usage of SC by animals both with drinking water and in the form of an

aerosol led to a significant decrease only in the content of free radicals in the lungs. A significant increase by 1.5-2 times in the activities of LOX in the lungs, as well as SSAO and DAO in the blood plasma, a generally accepted clinical indicator of this pathology, was observed in guinea pigs with BA. Consumption of SC by animals under both regimes was accompanied by a decrease in their activity to the normal level. The opposite pattern was observed regarding changes in DAO/histaminase activity in washings from the bronchial epithelium of animals with BA. This indicator was sufficiently suppressed (3 times), although it is known that under these conditions the histamine content exceeds physiological values by 1-2 orders of magnitude. The discovered fact may indicate a violation of the process of histamine utilization in the epithelium, which is one of the causes of destructive changes in the tissue. There was a further decrease in the activity of the enzyme on the background of SC consumption. The obtained experimental data allow us to conclude that all investigated Cu-AOs are directly involved in the development of signs of asthma, chronic inflammation, and remodeling of the respiratory tract, and the use of SC is effective in alleviating the late manifestations of the disease.

For modeling BLM-induced lung fibrosis in rats, 4 experimental groups were formed: Control, BLM (BLM was injected intratracheally at 5 mg/kg body weight once), BLM+SC (animals that immediately after inducing lung fibrosis for 3 weeks consumed a 0.005% solution of SC), Control+SC (intact animals that consumed the SC solution simultaneously with the BLM+SC group). The development of signs of pulmonary fibrosis in rats was confirmed by histological and morphometric studies. Consumption by animals of 0.005% SC restrained the appearance of pathological changes in this tissue. In the lungs of rats with induced fibrosis, there was an increase in the activity levels of all studied AOs by 1.5-2 times compared to the control. SC in the selected dose inhibited the activation of copper-containing enzymes. Besides, oxidative stress developed in the lungs of animals with fibrosis, which was not compensated by the corresponding activation of the antioxidant system. Consumption of SC inhibited the development of signs

of oxidative stress in the lungs and blood of experimental animals. The content of cytochromes P-450 in the liver of animals of the Control+SC group did not change compared to the control group. This testifies to the safety of the applied amount of this compound. Thus, on the model of BLM-induced lung fibrosis in rats, it was shown that the morphological signs of the development of the pathological state of the target organ are accompanied by an increase in the activity of all investigated AOs. It was established that consumption of 0.005% SC by sick animals was effective in reducing the signs of airway remodeling as a result of inhibition of Cu-AOs activity in the lungs of animals on the 21st day after induction of pathology.

Metabolic reprogramming of cancer cells is a necessary molecular basis for the progression of tumor growth associated with increased metastasis and chemoresistance. It has been previously demonstrated that increased expression of the adaptor protein Ruk/CIN85 in cancer cells leads to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and the development of cancer stem cell (CSCs) features. Therefore, the aim of the last stage of the work was to clarify the relationship between the inhibition of Ruk/CIN85 expression and metabolic reprogramming in mouse Lewis lung carcinoma (LLC) cells. LLC cells with stable knockdown of Ruk/CIN85 (subline B1) and control cells (Scr) were used as a model. Lactate dehydrogenase (LDH) activity and lactate content, major markers of aerobic glycolysis in tumor cells, were reduced in B1 vs. Scr by 2-fold and 1.5-fold, respectively. In B1 cells, the level of  $H_2O_2$  was 1.5 times lower than in Scr, which correlated with a decrease in the activity of SOD, as one of the sources of  $H_2O_2$  in the cells, and a decrease in the activity of CAT and glutathione peroxidase (GPx) by 2.5 and 2 times, respectively. The activity of DAO in B1 cells decreased by 2 times, which may be related to the change in putrescine content. The activities of LOX and SSAO were reduced 3-fold in LLC-B1 cells relative to Scr, which may be related to a decrease in the degree of stiffness of the extracellular matrix, one of the hallmarks of malignancy. Thus, the decrease in the aggressiveness of the phenotype in cells with down-regulation of the adaptor protein Ruk/CIN85 positively correlates with the degree of expression of the Warburg effect, the

activity profile of the studied AOs, which confirms their direct involvement in the control of the oncological process, in general, and the control of stemness and chemoresistance, in particular.

The results obtained during the dissertation research provide grounds for a general conclusion: All studied AOs are a source of oxidative, carbonyl and nitrosative stress, which makes them involved in the development of pathological conditions of the kidney and lungs, while the activity levels of these enzymes correspond to the degree of the course of the disease. Moreover, these indicators are markers of changes in RNS metabolism and are influenced *in vivo* by a specific inhibitor, semicarbazide, which can be used in the development of therapeutic approaches in the complex treatment of systemic diseases.

**Key words:** amine oxidases, reactive oxygen species, oxidative stress, reactive nitrogen species, nitric oxide, inducible NO-synthase, antioxidants, nephropathy, type 1 diabetes, inflammation, pulmonary fibrosis, cytochrome P-450, Lewis lung carcinoma, cancer cells, cytotoxicity.

Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації (основний):

Статті

1. **Gudkova OO**, Latyshko NV, Shandrenko SG. Amine oxidases as important agents of pathological processes of rhabdomyolysis in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, 88(1):79-87 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj88.01.079>
2. **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 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj90.05.098>
3. **Gudkova OO**, Krysiuk IP, Shandrenko SG. Innovative proposals on the implementation of dietary supplements for diabetes mellitus and helicobacteriosis. *Science and Innovation.* 2018, 14(5):37-42 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/scine14.05.034>
4. **Hudkova OO**, Krysiuk IP, Kishko TO, Popova NM, Drobot LB, Latyshko NV. Semicarbazide diminishes the signs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 2021, 93(5):72-81 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj93.05.072>
5. **Hudkova O**, Krysiuk I, Drobot L, Latyshko N. Rhabdomyolysis Attenuates activity of Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase, a Marker of Nephropathy in Rats with Streptozotocin-induced Diabetes. *Ukr. Biochem. J.*, 2022, 94(1):23-32 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj94.01.023>
6. **Hudkova O**, Luhovskyi S, Drobot L, Latyshko N. Involvement of Cu-containing Amine Oxidases in the Development of Lung Pathology in Ovalbumin-Induced Bronchial Asthma in Guinea Pigs. *Ukr. Biochem. J.*, 2022, 94(3):26-38 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj94.03.026>
7. Horak IR, **Hudova OO**, Latyshko NV, Kishko TO, Khudiakova OV, Krysiuk IP, Shandrenko SG, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects redox balance in breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(4):24-34 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.024>
8. Horak IR, Latyshko NV, **Hudkova OO**, Tokarchuk KO, Kishko TO, Yusova OI, Drobot LB, Tykhomyrov AA. Adaptor protein Ruk/CIN85 regulates



redox balance in 4T1 mouse breast cancer cells exposed to plasmin(ogen). *Experimental oncology*. 2022, 44(1):31-38 (SCOPUS).  
<https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-1.17241>

9. Labudzynski DO, Zaitseva OV, **Gudkova OO**, Latyshko NV, Veliky MM. Vitamin D<sub>3</sub> contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver of diabetic mice. *Ukr. Biochem. J.*, 2015, 87(3):75-90 (SCOPUS).  
<https://doi.org/10.15407/ubj87.03.075>

#### Тези доповідей

1. **Gudkova. OA**, Latyshko NV, Portova PA. The rat thymocytes response to oxidative stress conditions. Матеріали VIII міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» 23-27 квітня 2012р .м.Севастополь, с.169-170.
2. **Гудкова OO**, Латишко НВ, Токарчук КО, Чумаченко ІМ, Шандренко СГ. Особливості розвитку оксидативного стресу за комбінованої моделі цукрового діабету та рабдоміолізу. Матеріали XI Українського біохімічного конгреса. 2-6 жовтня 2014 р., м. Київ. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, 86(5, Suppl. 1):146.
3. Parilova O, Latyshko N, **Gudkova O**, Shandrenko S. Semicarbazide-containing drug effect on extracellular matrix deposition in chronic ovalbumin-induced asthma through amine oxidase inhibition. 15th FEBS Young Scientists Forum and 40th FEBS Congress 2nd to 4th July 2015 in Berlin, Germany. abstract A-700-0014-00433. *The FEBS Journal*, 2015, v. 282, p. 132.
4. **Gudkova OO**, Zaitseva OV, Latyshko NV, Shandrenko SG. Attenuation of lysyl oxidase hyperactivity in rats' bleomycin-induced lung fibrosis. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90(Special Issue):192.
5. Horak I, **Gudkova O**, Latyshko N, Khudiakova O, Shandrenko S, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a component of signaling networks that regulates breast cancer chemoresistance in concentrationdependent manner. The materials of 6<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. 18-21 June 2019, Yaremche, Ukraine. *Abstract book*: 20.

6. **Gudkova O**, Latyshko N, Kishko T, Khudiakova O, Horak I, Drobot L. Ruk/CIN85 adaptor protein as a regulator of oxidative /carbonyl stress in mice adrenocarcinoma cell line 4T1. The materials of 6<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. 18-21 June 2019, Yaremche, Ukraine. *Abstract book*: 124<sup>a</sup>.
7. Horak I, **Gudkova O**, Latyshko N, 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*. 30 вересня – 4 жовтня 2019 р, Тернопіль, Україна. *Медична та клінічна хімія*. 2019; **21**(3, додаток):77.
8. **Гудкова ОО**, Латишко НВ, Токарчук КО, Шандренко СГ. Молекулярні механізми патогенезу бронхіальної астми: внесок амінооксидаз. *Матеріали XII Українського біохімічного Конгресу*. 30 вересня – 4 жовтня 2019 р, Тернопіль, Україна. *Медична та клінічна хімія*. 2019; **21**(3, додаток):81.
9. **Hudkova O.**, Latyshko N., Skaterna T., Gerashchenko D., Korshun R., Tokarchuk K., Kishko T., Krysiuk I., Khudiakova O., Horak I., Drobot L. Down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 in Lewis lung carcinoma cells induces selective responses across metabolic networks associated with suppression of warburg effect. The 5<sup>th</sup> international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020, Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*:57.
10. Horak I, Latyshko N, **Hudkova O**, Tokarchuk K, Kishko T, Krysiuk I, Khudiakova O, Skaterna T, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a potential driver of metabolic reprogramming in breast cancer cells. The 5<sup>th</sup> international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*:59.
11. **Hudkova O**, Latyshko N, Krysiuk I, Kishko T, Tokarchuk K, Popova N, Volodina T, Shandrenko S. Semicarbazide inhibits the signs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. The 5<sup>th</sup> international scientific conference current

problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*:92.

12. Коршун РС, **Гудкова ОО**, Скатерна ТД, Горак ІР, Латишко НВ. Нокдаун адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в клітинах карциноми легені Льюїс призводить до метаболічного репрограмування, асоційованого зі зниженням агресивності їх фенотипу. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2021”, Київ, 20-21 травня 2021, стор. 28.

13. Horak IR, **Hudkova OO**, Latyshko NV, Kishko TO, Shkoda MO, Kyrychenko MR, Korshun RS. Adaptor protein Ruk/CIN85 as a potent inducer of the Warburg effect in breast cancer cells. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2021”, Київ 20-21 травня 2021, стор. 26.

14. Horak I, Skaterna T, Latyshko N, **Gudkova O**, Khudiakova O, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates expression/activity of enzymes involved in ECM reorganization and regulates invasiveness of cancer cells. Materials of the 27<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cancer Research (09-12 June 2021, held online).

15. Horak I, **Hudkova O**, Latyshko N, Yusova O, Tokarchuk K, Bekala M, Drobot L, Tykhomyrov A. Exogenous plasminogen/plasmin affects proliferation, motility, and redox balance in breast cancer cells depending on adaptor protein Ruk/CIN85 expression levels. *Oncology* 2021; 3:15-16. Materials of the young scientists conference "Modern oncology: from basic research to new therapeutic approaches", Kyiv, Ukraine, 12-13 October 2021.

16. Korshun RS, **Hudkova OO**, Latyshko NV, Kishko TO, Horak IR, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 participates in the metabolic control of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2022”, Київ 31 травня 2022. *Biotechnol. acta*, 2022; 15(2)58-59 <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.058>.

17. Bekala MI, Horak IR, **Gudkova OO**, Latyshko NV, Tokarchuk KO, Geraschenko DS, Shkoda MO, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 is involved in the glucose metabolism reprogramming in breast cancer cells. *Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2022”*, Київ 31 травня 2022. *Biotechnol. acta*, 2022; 15(2):47-48. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.047>.
18. **Hudkova O**, Tokarchuk K, Latyshko N, Skaterna T, Gerashchenko D, Korshun R, Kishko T, Krysiuk I, Khudiakova O, Horak I, Drobot L. Metabolic reprogramming of Lewis lung carcinoma cells induced by down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 results in attenuation of their chemoresistance. “Current Problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology”, 6-7 October 2022, Dnipro, Ukraine “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 6-7 жовтня 2022 р. Дніпро, Україна, Abstract book:183-185.

Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації (додатковий):

Статті

1. Latyshko N, **Gudkova O**, Dmytrenko M. Semicarbazide as potential source of formaldehyde and nitric oxide formation. *Drugs and Therapy Studies*. 2012. 2:e9:43-47. <https://doi.org/10.4081/dts.2012.e9>.
2. **Гудкова OO**, Латишко НВ, Гудкова ЛВ, Шандренко БС. Спосіб ензиматичного одержання кисню. *Бюлл. №20*. 2017. UA 119988 U.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- 3-NT – (3-nitrotyrosine), 3-нітротирозин  
 ALDH – (aldehyde dehydrogenase), альдегіддегідрогеназа  
 BAPN – ( $\beta$ -aminopropionitrile)  $\beta$ -амінопропіонітрил  
 BLM – (bleomycin C) блеомицин-С  
 BMP-1 (bone morphogenetic protein 1) - протеїназа проколагену С  
 CAT – (catalase) каталаза  
 CSCs – (cancer stem cells), ракові клітини, подібні до стовбурових, або ракові стовбурові клітини;  
 CYP450 – (cytochrome P-450) цитохром P-450  
 DAO – (diamine oxidase) діамінооксидаза  
 EDTA – (ethylenediaminetetraacetic acid) етилендіамінтетраоцтова кислота  
 eIF5A – (eucariotic initiation factor 5A), ізоформа 1 фактора ініціації трансляції еукаріотів 5A  
 FA – (formaldehyde) формальдегід  
 FGF-2 – (fibroblast growth factor 2) фактор росту фібробластів-2  
 GLUT4 – (glucose transporter type 4) інсулін-чутливий транспортер глюкози 4 типу  
 GSH – (reduced glutathion) відновлена форма глутатіону  
 GPx – (glutathion peroxidase) глутатіонпероксидаза  
 HbNO – (nitrosyl hemoglobin) нітрозилгемоглобін  
 HIF-1 – (hypoxia-inducible factor-1) ізоформа 1 родини транскрипційних факторів, що індукуються гіпоксією  
 IgE - імуноглобулін класу E  
 IL-4, 13 – інтелейкіни 4 та 13, Th2-синтезовані проатопічні цитокіни  
 iNOS – (inducible NO-syntase) індукцйбельна NO-синтаза  
 LLC – (Lewis lung carcinoma) карцинома легені Льюїс  
 LOX – (lysyl oxidase) лізілоксидаза  
 LOXL 1-4 – (LOX- like proteins 1-4) LOX-подібні протеїни 1-4  
 LOX-PP – (propeptide of LOX) пропептид лізілоксидази  
 LTQ – (lysyl tyrosine quinone) лізілтирозин хінон  
 MAO – (monoamine oxidase) моноамінооксидаза  
 MetHb – метгемоглобін  
 MG – (methylglyoxal) метилгліоксаль  
 NDMA – (*N*-nitrosodimethylamine), *N*-нітросо-диметиламін  
 ODC – (ornithine decarboxylase) орнітиндекрбоксилази  
 OVA – (ovalbumine), овальбумін  
 PAO – (polyamine oxidase), поліамінооксидаза  
 PDGF – (platelet derived growth factor), фактора росту, що походить з тромбоцитів  
 PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) фенілметилсульфонілфторид, інгібітор серинових протеаз  
 Ruk/CIN85- адаптерний/риштувальний протеїн масою 85 кДа, що взаємодіє з Сб

SC – (semicarbazide), семікарбазид  
 SOD – (superoxide dismutase), супероксиддисмутаза  
 SSAO – (semicarbazide-sensitive amine oxidase), семікарбазидчутлива амінооксидаза  
 SSAT - *N1*-spermidine/spermine acetyl transferase) *N1* спермідин/спермін-ацетилтрансфераза  
 STZ – (streptozotocin) стрептозотоцин  
 SMO – (spermine oxidase), сперміноксидаза  
 TGF- $\beta$  – (transforming growth factor beta) трансформуючий фактор росту  $\beta$   
 Th2 – (type 2 T helper cells), хелперний Т-лімфоцит CD4+ 2-го типу  
 TPQ - (trihydroxy phenylalanine (TOPA)-quinone), тригідрокси-фенілаланінхінін хінон (ТОРА-хінон)  
 VAP-1 – (vascular adhesion protein-1), протеїн судинної адгезії 1  
 XO – (xanthine oxidase), ксантиноксидаза  
 АОази - амінооксидази  
 АМ – альвеолярні мішечки  
 АФА - активні форми азоту  
 АФК - активні форми кисню  
 АХ – альвеолярні ходи,  
 БА - бронхіальна астма  
 БАЛ - бронхо-альвеолярний лаваж  
 ЕТЛ - електронно-транспортний ланцюг  
 ГНН - гостра ниркова недостатність  
 ДНКЗ - динітрозильні комплекси заліза  
 ДХН - діабетична хвороба нирок  
 ЕМП - епітелійно-мезенхімний перехід  
 ЕПР - електронний парамагнітний резонанс  
 ФЛ - фіброз легені  
 МДА малоновий диальдегід  
 ПКМ - позаклітинний матрикс  
 ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів  
 РБ – респіраторні бронхіоли,  
 РКС - реактивні карбонільні сполуки  
 ЦТК – цикл трикарбонівих кислот

## ЗМІСТ

	Перелік умовних скорочень	21
	Вступ	25
	РОЗДІЛ I	34
	ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1	Сполуки з високою реакційною здатністю (активні форми кисню та азоту, реактивні карбонільні сполуки) та їх регуляторна роль в організмі людини і тварин	34
1.2	Амінооксидази як джерело активних форм кисню та реактивних карбонільних сполук	38
1.3	Високореактивні сполуки, біогенні аміни та поліаміни як регулятори та маркери патологічних станів нирки та легені	54
1.4	Скавенджери реактивних карбонільних сполук як потенційні терапевтичні агенти.	69
	РОЗДІЛ 2	72
	МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ	
2.1	Моделі <i>in vivo</i>	72
2.2	Моделі <i>in vitro</i>	75
2.3	Підготовка експериментальних зразків	78
2.4	Методи визначення ензиматичних активностей	81
2.5	Визначення вмісту метаболітів	85
2.6	Імуноензимний аналіз	86
2.7	Визначення рівня продукування NO в імунних клітинах	87
2.8	Спектроскопічні дослідження	87
2.9	Гістологічні та морфометричні дослідження	90
2.10.	Електрофорез протеїнів в ПААГ Вестерн-блот аналіз	91
2.11	Екстрагування колагену з бронхів та шкіри	92

2.12	Визначення концентрації протеїну	92
2.13	Статистична обробка результатів	94
	РОЗДІЛ 3	95
	РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	
3.1	Аміноксидази - важливі чинники патологічних процесів за умов гліцерол-індукованого рабдоміолізу у щурів	95
3.2	SSAO - маркер нефропатії за умов стрептозотоцин-індукованого діабету	103
3.3	Дослідження метаболічних шляхів біотрансформації, причин та меж токсичності семікарбазиду	116
3.4	Залучення мідь-вмісних амінооксидаз до розвитку патологічних змін за умов овальбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків	124
3.5	Ослаблення семікарбазидом ознак блеоміцин-індукованого фіброзу легені у щурів	138
3.6	Участь амінооксидаз у контролі агресивності фенотипу клітин карциноми легені Льюїс миші	151
	Аналіз та узагальнення результатів	162
	ВИСНОВКИ	168
	Список використаних джерел	170
	Перелік наукових праць, опублікованих за темою дисертації	191



## ВСТУП

**Актуальність теми.** Порухення в організмі балансу між генеруванням та утилізацією активних форм кисню та азоту (АФК, АФА), а також реактивних альдегідів (реактивних карбонільних сполук, РКС) під впливом різноманітних ендогенних та екзогенних чинників призводить до розвитку оксидативно-карбонільного та нітрозативного стресів, які можуть супроводжуватись індукуванням низки патологічних станів. За фізіологічних умов ці сполуки постійно утворюються в організмі в процесі метаболізму та беруть участь у його регулюванні. Між тим, наразі відсутні дані щодо ролі окремих ділянок обміну зазначених високо реактивних сполук в механізмах їх токсичної дії та розвитку патологічних станів, а також ефективних засобів зниження швидкості їх утворення та обміну в організмі.

Особливе місце серед метаболічних шляхів, в яких генеруються АФК та РКС, займають реакції окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів за участі амінооксидаз (АОаз), оскільки при цьому одночасно утворюються відповідний до субстрату альдегід, пероксид водню та амоній. Біогенні аміни як внутрішньоклітинні посередники беруть участь в роботі практично всіх органів та систем організму. Вони є важливими регуляторними сполуками в контролі клітинного циклу, проліферування та диференціювання, як нормальних клітин, так і трансформованих. Деякі з біогенних амінів, зокрема головний прозапальний амін – гістамін, є безпосередньо одним з основних чинників патологічних порушень в тканинах за умов дисрегулювання імунної відповіді організму. Вміст гістаміну в організмі регулюється головним чином за участі Cu-вмісної АОази DAO/гістамінази, експресію якої виявлено в нирці, кишечнику та плаценті. Рівень активності даного ензиму в плазмі хворих на бронхіальну астму вважається маркером загострення патології [1]. Більш того, непереносимість гістаміну, що потрапляє в організм у великій кількості з їжею, через порушення його адекватної утилізації внаслідок дефіциту DAO, вважається однією з можливих причин алергічних реакцій [2]. Інші

моноаміни (саркозин, адреналін, метиламін, аміноацетон) та поліаміни за патологічних умов виявляють токсичний вплив на організм опосередковано, через утворення надмірної кількості продуктів реакцій за участі таких АОаз як DAO, PAO та SSAO. Це означає, що дисбаланс між генеруванням та катаболізмом як біогенних амінів та поліамінів, так і продуктів їх деградації за цих умов може бути додатковим джерелом токсичних для організму сполук, які можуть ставати причиною ураження тканин органів-мішеней та ускладнень захворювань, що прогресують. Водночас, слід зазначити, що як механізми, так і відомості про наслідки їх системних ефектів наразі відсутні.

Низка патологічних станів характеризується гіперактивуванням SSAO, яка у ссавців існує в двох формах: мембранозв'язаній (її містить більшість органів і тканин) і розчинній (плазма крові). Вміст SSAO в плазмі суттєво збільшується за цукрового діабету та інших захворювань. За умов патології цей ензим може бути причиною морфологічних порушень тканин високо васкуляризованих органів, зокрема, нирки за рабдоміолізу та діабету, а також легені за бронхіальної астми. SSAO, крім ензиматичної деградації первинних амінів, бере участь в міграції лейкоцитів в місця запалення як протеїн-1 судинної адгезії (VAP-1), а за умов розвитку раку сприяє здатності пухлинних клітин уникати імунної відповіді організму. Таким чином, за умов хронічного запалення VAP-1 може відігравати важливу роль у прогресуванні хвороби нирок, бронхіальної астми та онкологічних захворювань, що потребує перевірки та підтвердження.

Ще один представник АОаз, LOX, причетний до процесу ковалентного зшивання молекул колагену та еластину і, як наслідок, до реорганізації структурно-функціонального стану позаклітинного матриксу (ПКМ). Даний ензим є важливим, зокрема, для морфогенезу органів дихальної системи та шкіри. Експресія LOX помітно зростає в фіброзних тканинах, а також пухлинах, як в первинних, так і за умов прогресування онкологічного захворювання. Останні дослідження вказують на наявність каталітичної активності представників родини LOX щодо розчинних субстратів,

залучених до сигналювання, таких як цитокіни (FGF2, TGF- $\beta$ , PDGF) та гістони, чим визначається особлива роль даного ензиму у трансдукції клітинних сигналів та регулюванні транскрипції. Участь SSAO і LOX у розвитку фіброзу легені та канцерогенезі активно вивчається, тоді як інформація щодо комплексного дослідження причетності інших АОаз до патогенезу захворювань нирки та легені на даний час відсутня.

У функціонуванні нирки та легені важливу регуляторну роль відіграє оксид азоту (NO), який утворюється за участі NO-синтаз (NOS) з L-аргініну [3]. Джерелом азоту для синтезу аргініну є амоній. Як амонієгенез, так і синтез аргініну локалізовані в одній й тій самій ділянці нирки, звідки ця амінокислота потрапляє у кров'яне русло. У відповідь на різноманітні стимули завдяки підвищенню активності індукцибельної NOS (iNOS) різко зростає генерування NO, що може сприяти патогенезу низки поширених захворювань нирки [4]. В свою чергу, в легені АФА стимулюють більшість респіраторних функцій, але щодо ролі цих похідних NO у розвитку легеневої патології існують досить протилежні та суперечливі дані [5, 6, 7]. Таким чином, підвищені концентрації NO можуть сприяти ураженню нирки та легені. Враховуючи те, що амоній може бути джерелом азоту для синтезу аргініну в нирці, а сам аргінін є попередником не тільки NO, але й поліамінів – субстратів АОаз, можна припустити наявність регуляторного зв'язку між функціонуванням цих ензимів та обміном АФА ще одного класу реактивних сполук. Наразі дані стосовно висловленого припущення в літературі відсутні, що потребує додаткового вивчення.

З огляду на вищесказане, дослідження біологічної ролі АОаз (SSAO, LOX, DAO та PAO), як чинників і маркерів патоморфологічних порушень та функціонального стану тканин органів-мішеней, а також взаємозв'язку між функціонуванням цих ензимів, як джерела АФК та РКС, та обміном АФА, є актуальною проблемою сучасної медико-біологічної науки. Застосування необоротних інгібіторів Су- та TRQ-залежних АОаз, зокрема семікарбазиду (SC), допоможе з'ясувати участь цих ензимів у розвитку патологічних

процесів та дасть відповідь на питання про можливість зменшення проявів захворювання шляхом пригнічення даної ланки метаболізму.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.** Роботу виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України в рамках НДР за темами: «Порівняльне дослідження біологічної дії ендогенних альдегідів як регуляторів метаболізму та чинників його порушень при патологічних станах різного генезу» (2010-2014рр., № державної реєстрації 0110U002700 «фундаментальні дослідження»), «Роль амінооксидаз у розвитку карбонільно-оксидативного стресу за патологій різного генезу» (2015-2017 рр., № державної реєстрації 0115U003644 «фундаментальні дослідження»), «Механізми регуляції внутрішньоклітинних сигнальних мереж, міжклітинних та міжмолекулярних взаємодій» (2012-2016 рр., № державної реєстрації 0112U2624), «Механізми ядерного та метаболічного репрограмування пухлинних клітин, асоційовані з прогресією онкологічних захворювань: внесок адаптерного протеїну Ruk/CIN85» (2020-2024 рр., № державної реєстрації 0120U002191).

**Мета і завдання дослідження.** Метою дисертаційної роботи було дослідити біологічну роль АОаз у розвитку патології нирки та легені, а також потенційний вплив SC, інгібітора Cu-АОаз, на прояви захворювань. Відповідно до мети дослідження були поставлені такі завдання:

1. На моделі рабдоміолізу у щурів дослідити зміни активностей АОаз (SSAO, DAO та PAO), а також антиоксидантних ензимів (каталази (CAT) та супероксиддисмутази (SOD)), у нирці та тимусі піддослідних тварин.

2. На моделі стрептозотоцин-індукованого діабету у щурів та діабету, ускладненого рабдоміолізом, вивчити зміни активностей SSAO, про- та антиоксидантних ензимів, а також показників нітрозативного стресу в нирці, крові та печінці піддослідних тварин.

3. В досліді *in vitro* вивчити шляхи метаболічного перетворення SC й ідентифікувати продукти деградації даної сполуки.

4. На моделі хронічної овальбумін(OVA)-індукованої бронхіальної астми у мурчаків дослідити причетність Cu-AOаз до патологічних змін тканини легені як органу-мішені шляхом застосування SC.

5. На моделі Блеоміцин C(BLM)-індукованого фіброзу легені у щурів дослідити можливість модулювального впливу SC на профіль активностей AOаз (SSAO, LOX, DAO та PAO), показники оксидативно/карбонільного стресу в легені та крові.

6. На моделі високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс миші (LLC) дослідити рівні активностей AOаз (SSAO, LOX, DAO та PAO), альдегідгидрогенази (ALDH), лактатдегідрогенази (LDH), а також оцінити стан окисного метаболізму клітин за вмістом пероксиду водню та рівнями активностей антиоксидантних ензимів залежно від рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

**Об'єкт дослідження:** Молекулярні механізми патогенезу захворювань нирки та легені.

**Предмет дослідження:** Біологічна роль AOаз у розвитку патології нирки та легені експериментальних тварин.

**Методи дослідження:** методи препаративної біохімії, клітинної та молекулярної біології, ензимології, диференційне центрифугування, спектрофотометрія, спектрофлуориметрія, цитофлуориметрія, імуноензиматичний аналіз, ЕПР-спектроскопія, світлова мікроскопія, статистичний аналіз.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше показано багаторазове підвищення відносно контролю рівнів активностей досліджених AOаз: в нирці, органі-мішені рабдоміолізу (SSAO, PAO, DAO) та цукрового діабету (SSAO) за умов їх моделювання у щурів; легені, органі-мішені бронхіальної астми, відтвореної у мурчаків, (LOX SSAO, DAO) та пульмонологічного фіброзу у щурів (LOX SSAO, DAO, PAO). Виявлено взаємозв'язок між функціонуванням AOаз та метаболізмом АФА. Оригінальними є дані, що потужне зростання активності SSAO в нирці щурів

за умов розвитку діабету супроводжується підвищенням рівня показників нітрозативного стресу в крові та печінці, тоді як за умов діабету, ускладненого рабдоміолізом, зв'язування надмірної кількості АФА в тканинах піддослідних тварин як вільним  $Fe^{3+}$ , так і  $Fe^{2+}$  в складі залізо-сірчанних комплексів протеїнів призводить до нормалізування низки біохімічних показників. На моделях OVA-індукованої бронхіальної астми у мурчаків та BLM-індукованого фіброзу легені у щурів вперше продемонстровано безпосередню участь Cu- та хінон-залежних АОаз (SSAO, LOX, DAO) у розвитку патологічного стану легені шляхом застосування їх необоротного інгібітора SC. Вперше встановлено, що пригнічення експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 у високоінвазивних аденокарциномних клітинах легені миші Льюїс супроводжується узгодженим зниженням як рівнів активностей досліджуваних АОаз, так і ензимів/метаболітів, залучених до реалізації ефекту Варбурга, що вказує на безпосередню їх причетність до канцерогенезу. В досліджах *in vitro* продемонстровано, що метаболічне перетворення SC в організмі відбувається за участі CYP450 мікросомної фракції печінки з утворенням формальдегіду, амонію та NO, які, залежно від концентрації інгібітора, можуть зумовлювати прояв токсичних ефектів. Монооксигеназна система печінки виявилась нечутливою до SC в концентрації нижче 1,5 мМ.

Теоретичні положення, сформульовані за результатами проведеної роботи, розширюють існуючі уявлення про молекулярні механізми розвитку патології нирки та легені та засвідчують пряму причетність амінооксидаз до ураження відповідних тканин.

**Практичне значення роботи.** Отримані дані свідчать про те, що SC, як інгібітор Cu-залежних АОаз, при застосуванні у концентраціях 0,005-0,05% ефективно знижує прояви патології фіброзу легені і є безпечним для організму тварин. Результати проведених досліджень можуть бути використані як експериментальний базис для пошуку та розробки сполук з високою інгібіторною активністю по відношенню до АОаз, що дозволило б

підвищити ефективність програм комплексного лікування досліджуваних захворювань.

**Особистий внесок здобувача.** Представлена дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, яке було реалізоване автором відповідно до програми експериментальних досліджень, спланованих і виконаних протягом 2011-2022 р.р. Дисертантом було самостійно проведено аналіз даних літератури за темою роботи та виконано експериментальні дослідження по вивченню: 1) залучення амінооксидаз до розвитку патологічних станів нирки та легені, а саме: отримання тканинних зразків експериментальних тварин та цитоплазматичних екстрактів клітин, визначення в них рівнів ензиматичних активностей: амінооксидаз (SSAO, DAO, PAO, LOX), про- та антиоксидантних ензимів (ХО, SOD, САТ, GPx), лактатдегідрогенази, альдегіддегідрогенази, метаболітів: пероксиду водню та лактату в модельних дослідах *in vivo* (експериментального рабдоміолізу, цукрового діабету 1 типу, діабету, ускладненого рабдоміолізом, овальбумін-індукованої бронхіальної астми, блеоміцин-індукованого фіброзу) та *in cellulo* (високоінвазивні клітини карциноми легені Льюїс); 2) шляхів метаболічного перетворення семікарбазиду мікросомною фракцією печінки щурів *in vitro* (отримання мікросомної фракції печінки щурів, вивчення їх диференційних спектрів за та без присутності семікарбазиду, визначення продуктів біотрансформації семікарбазиду мікросомною фракцією печінки щурів).

Постановку експериментів *in vivo* та *in vitro* було проведено разом із співробітниками відділу регуляції обміну речовин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (2011-2015 рр).

Окремі дослідження з визначення низки показників проводились за участі наукових співробітників: отримання даних ЕПР-спектроскопії – в.о. зав. відділу регуляції обміну речовин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, к.б.н., п.н.с. Шандренка С.Г. у співпраці з Інститутом екогігієни та токсикології ім. Л.І. Медведя НАН України (2011-2015 рр), дані

флуоцитометрії, імунологічні показники, вміст 3-нітротирозину - співробітниці відділу регуляції обміну речовин Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (пров. інж. Парілової О.А., 2014 р.), гістологічні та морфометричні дослідження респіраторного відділу легені тварин - спіробітника Інституту геронтології ім. Д.Ф. Чеботарьова НАМН України, к.б.н. Луговського С.П. (2014 р.). Постановку експерименту *in cellulo*, Вестерн-блот аналіз - співробітників відділу сигнальних механізмів клітини Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України к.б.н, н.с. Скатерної Т.Д, к.б.н, н.с. Худякової О.В. (2019-2022 рр).

Планування роботи, розробка схем постановки експериментів *in vivo* та *in vitro*, підготовка матеріалів до публікацій, аналіз та обговорення отриманих експериментальних даних, формулювання основних положень та висновків дисертаційної роботи було проведено спільно з науковими консультантами к.б.н. н. с. Латишко Н.В та к.б.н., с. н. с. Шандренко С.Г., а також науковим керівником д.б.н. проф. Дробот Л.Б.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи представлено на: VIII Міжнародній науково-технічній конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» (Україна, Севастополь, 2012), XI Українському Біохімічному Конгресі (Україна, Київ, 2014), X Міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Україна, Львів, 2014), 15-у Форумі молодих вчених FEBS та 40-у Конгресі FEBS (Німеччина, Берлін, 2015), XI Парнасівській Конференції Форумі молодих вчених «Біохімія та молекулярна біологія для інноваційної медицини» (Україна, Київ, 2018), XII Українському Біохімічному Конгресі (Україна, Київ, 2019), 6-му Українському конгресі з міжнародним представництвом з клітинної біології (Україна, Яремче, 2019), 5-ій та 6-й Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми біохімії, біології клітини та фізіології» (Україна, Дніпро, 2020 та 2022 рр), 27-у конгресі Європейської асоціації з дослідження раку (2021 р., онлайн), конференції-



конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2021», (Україна, Київ, 2021 та 2022 рр).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових робіт, зокрема, 9 статей у фахових виданнях, що відповідають вимогам Постанови №44 Кабінету Міністрів України від 12.01.2022 р «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії», 1 патент на корисну модель.

**Структура і обсяг роботи.** Дисертація загальним обсягом 195 сторінок складається з анотації українською та англійською мовами, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи досліджень», шести розділів власних досліджень, аналізу й узагальнення отриманих результатів та висновків. Список використаних джерел містить 196 найменувань, з яких 18 кирилицею. Текст супроводжується 35 рисунками і 17 таблицями.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Сполуки з високою реакційною здатністю (активні форми кисню та азоту, реактивні карбонільні сполуки) та їх регуляторна роль в організмі людини і тварин

Аеробний метаболізм супроводжується постійним утворенням продуктів неповного відновлення молекулярного кисню, активних форм кисню (АФК), які володіють надзвичайно високою реакційною здатністю. До них відносять: супероксид-аніон ( $O_2^{\cdot-}$ ), пероксид водню ( $H_2O_2$ ), гідроксильний радикал ( $\cdot OH$ ), гідроксид-іон ( $OH^-$ ) [8]. Перетворення однієї АФК в іншу відбувається наступним чином:  $O_2^{\cdot-}$  конвертує до  $H_2O_2$ , який, у свою чергу, за присутності іонів заліза (II) перетворюється на  $\cdot OH$  (реакція Фентона). З одного боку,  $H_2O_2$  легко вступає у вільнорадикальні реакції, а з іншого - є нейтральною молекулою, що робить її здатною вільно дифундувати як через внутрішньоклітинні мембранні структури, так і через плазматичну мембрану, і виявляти свої ефекти на сайтах значно віддалених від місць його генерування, функціонуючи, головним чином, як вторинний посередник у трансдукції внутрішньо- та міжклітинних сигналів. Інші представники групи АФК мають вільнорадикальну природу. Так,  $O_2^{\cdot-}$  реагує з протеїнами, змінює їх окисно-відновний стан, але не викликає змін у структурі, тоді як  $\cdot OH$  є найагресивнішим з усіх АФК оскільки вступає в взаємодію миттєво після генерування та спричиняє структурні зміни біомолекул, чим і зумовлені його токсичні ефекти.

За фізіологічних умов АФК генеруються на певних ділянках метаболізму, таких як система мікросомного окислення ксенобіотиків за участі родини ензимів цитохром-Р450 (CYP450), метаболізм пуринів та піримідинів, реакції, що каталізуються оксидоредуктазами, та окиснення біомолекул за присутності металів з перехідною валентністю. Фізіологічні кількості АФК необхідні для підтримання гомеостазу в процесах реалізації імунної відповіді та передачі внутрішньоклітинних сигналів. Але ці сполуки

за умов їх надмірного продукування (стан відомий як оксидативний стрес), здатні до надзвичайно потужних деструктивних впливів по відношенню до основних клітинних компонентів, результатом чого є окисна модифікація ліпідів, протеїнів та нуклеїнових кислот. Тому рівні концентрацій АФК в організмі підлягають жорсткому контролю, який забезпечує багатокомпонентна ієрархічна антиоксидантна система, ключовими компонентами якої є ензими супероксиддисмутаза (EC 1.15.1.1, SOD), каталаза (EC 1.11.1.6, CAT) та глутатіонпероксидаза (EC 1.11.1.9, GPx) [9]. Не менш важливу роль у елімінаванні АФК відіграють неензимні антиоксидантні протеїни (трансферин, феритин, церулоплазмін, гаптоглобін, транскобаламін), що беруть участь у транспорті та зв'язуванні іонів металів зі змінною валентністю (заліза, міді, селену, кобальту), а також низькомолекулярні сполуки та вітаміни (токофероли, вітамін А, каротиноїди, убіхінон, флавоноїди, стероїдні гормони, вітамін С, глутатіон (GSH), карнозин).

Оксид азоту ( $\cdot\text{NO}$ ), ще один представник класу сполук вільнорадикальної природи, постійно генерується в організмі з L-аргініну за участі NO-синтаз (NOS) і є внутрішньоклітинним посередником, який регулює такі фізіологічні функції як нервова та серцево-судинна діяльність (ендотелійна вазодилатація). З іншого боку,  $\cdot\text{NO}$  сам здатен генерувати низку реактивних сполук, що утворюють окрему родину вільнорадикальних сполук, активні форми азоту (АФА). АФА відрізняються між собою за реакційною здатністю, періодом напівжиття, розчинністю в ліпідах та біологічною активністю [10]. Найагресивнішим з них є пероксинітрит ( $\text{NOOO}^-$ ), що утворюється неензиматичним шляхом дисмутації  $\cdot\text{NO}$  та  $\text{O}_2^{\cdot-}$  за умов надмірного генерування останнього. До АФА також відносять протоновану/відновлену форми  $\cdot\text{NO}$  (нітроксил/нітроксид-аніон,  $\text{HNO}/\text{NO}^-$ ), окислену його форму (катіон нітрозонію,  $(\text{NO}^+)$ ), динітрозильні комплекси заліза (ДНКЗ), які є результатом взаємодії NO з негемовим залізом у складі заліzosірчаних кластерів протеїнів, та продукти пострасляційних

модифікацій протеїнів оксидом азоту, зокрема, шляхом нітрування залишків тирозину [11] та нітрозилування сульфгідрильних груп (S-нітрозилування). При цьому за умов нітрозилування глутатіону (GSH), утворений S-нітрозоглутатіон (GSNO), в свою чергу, здатен також модифікувати протеїни (S-глутатіонування) [12]. Існує припущення, що  $\cdot\text{NO}$  в біологічних системах може перетворюватись на нітроксил або нітрозоній в реакціях відновлення/окиснення з металами з перехідною валентністю, зокрема за рахунок включення в ДНКЗ, які в свою чергу, містять різноманітні аніонні ліганди, такі як тіолові групи, внаслідок чого можуть відбуватись реакції S-нітрозилування. За умов надмірного генерування оксиду азоту, утворення RSNO в численних біологічних системах, індуковане ДНКЗ, було доведено методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), за допомогою якого можна ідентифікувати якісно і кількісно сполуки вільнорадикальної природи, зокрема АФА та АФК.

Крім того, між АФК та АФА можуть виникати перехресні хімічні та/або фізіологічні взаємодії, що призводитиме до посилення негативних ефектів сполук обох родин. Припускається, що за стресових умов, коли продукування АФА стає надмірним внаслідок активації індукцибельної форми NOS (iNOS) та розвитку нітрозативного стресу, ці сполуки стають шкідливими для клітин-мішеней, і це може відігравати роль у різноманітних дегенеративних процесах за умов прогресування низки захворювань людини. Цілком логічно з біологічної точки зору, що такі загрозливі потенційні ефекти АФА призвели до формування в організмі відповідної системи їх нейтралізації, компонентами якої, як і у випадку АФК, є низькомолекулярні (GSH, металопорфірини, головним чином у складі гемових протеїнів, які надзвичайно швидко зв'язують  $\text{NO}$ , сполуки селену, сечова кислота,  $\beta$ -каротин, вітаміни E і C) та високомолекулярні (ензими SOD та GPx, а також протеїни тіоредоксин [13], та  $\gamma$ -глутамілтранспептидаза [14]) антиоксиданти.

За певних несприятливих умов, як ендогенного, так і екзогенного характеру, може виникнути дисбаланс між генеруванням та утилізацією

кисневих радикалів, що супроводжується їх нерегульованим накопиченням та формуванням оксидативного стресу. Як наслідок, відбувається інтенсифікація деструктивних процесів в біліпідному шарі клітинних мембран, а саме вільнорадикальне розщеплення ланцюга залишків поліненасичених жирних кислот у складних ефірах холестеролу, фосфоліпідах і тригліцеридах з утворенням широкого спектру іншого виду реакційних сполук – альдегідів, відомих також як реактивні карбонільні сполуки (PKC), до яких відносять малоновий диальдегід (MDA), гліоксаль (GO), 4-гідрокси-2-ноненаль (4-HNE) та 4-оксо-транс-2-ноненаль [15, 16, 17]. Іншим джерелом PKC, таких як метилгліоксаль (MGO) та його попередників, аміноацетону і сукцинілацетону, можуть бути амінокислоти треонін і гліцин за їх окислювальної модифікації, а також окисне дезамінування біогенних амінів та поліамінів, що призводить до утворення формальдегіду (FA), MGO та низки аміноальдегідів, здатних спонтанно перетворюватися на акролеїн.

За фізіологічних умов, PKC, так само як і АФК, виконують важливі функції як модулятори імунної системи, регулятори експресії генів та внутрішньоклітинні сигнальні посередники. Регуляторна роль PKC у клітинному метаболізмі опосередкована їх електрофільною природою, оскільки підтримання обміну речовин в клітині потребує рівноваги між донорами та акцепторами електронів, і головну ланку останніх складають саме альдегіди. Ефекти PKC спрямовані на диференційний контроль експресії генів, що кодують антиоксидантні ензими, ензими детоксикації інших електрофільних сполук і ксенобіотиків, і реалізуються через Keap1/Nrf2 редокс-чутливий шлях та такі фактори, як AhR, PPAR $\gamma$ , NF $\kappa$ B, SIRTFOXO, протеїни теплового шоку й множинної резистентності до ліків. Водночас, down-регулювання експресії iNOS і циклооксигенази-2 також впливає на біологічні ефекти PKC [18]. Час життя PKC набагато триваліший порівняно з АФК, що забезпечує можливість діяти дистантно від ділянок генерування та визначає високий ступінь агресивності альдегідів [19].

Реактивні альдегіди реагують з нуклеофільними групами протеїнів, нуклеїнових кислот та амінофосфоліпідами, що призводить до їх незворотної модифікації, поперечних зшивок, в результаті чого утворюються різноманітні аддукти, так звані кінцеві продукти глікування або ліпоксидзації (advanced glycation end products (AGE), advanced lipoxidation end products (ALE)). Ці сполуки важко піддаються деградації, і тому, за умов їх накопичення через порушення утилізації РКС, вони можуть зумовлювати розвиток низки патологічних станів. Підтримання низьких рівнів цих сполук в клітинах забезпечується шляхом їх ензиматичного перетворення у менш токсичні продукти в реакціях за участі ензимів глутатіон-S-трансферази (EC 2.5.1.18, GST), ALDH, альдегідредуктази (EC 1.1.1.21, ALRD), алкогольдегідрогенази (EC 1.1.1.1, ADH), альдегідоксидази (AOX) з родини ксантиноксидаз (EC 1.17.3.2, XO) [20, 21].

## 1.2. Амінооксидази як джерело активних форм кисню та реактивних карбонільних сполук

### – *Класифікація амінооксидаз та їх каталітичні властивості*

З великої кількості метаболічних шляхів, в яких генеруються АФК та РКС, особливе місце займають реакції окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів за участі ензимів АОаз, оскільки при цьому продукуються обидва зазначених класи реактивних сполук (Рис. 1.1).



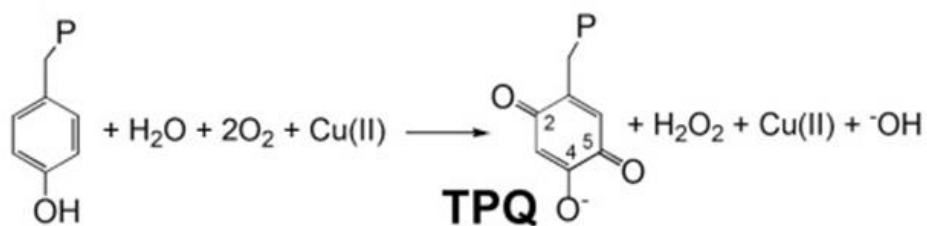
**Рис.1.1.** Реакція окисного дезамінування амінів та поліамінів

Згідно класифікації, АОази залежно від хімічної природи приєднаного кофактора поділяють на дві групи (Рис. 1.2). Перша група - це FAD-вмісні

ензими, до яких належить моноамінооксидаза (**m**ono**a**mine **o**xidase, MAO, EC1.4.3.4) та поліамінооксидаза (**p**oly**a**mine **o**xidase, PAO, EC 1.5.3.17). Друга група ензимів - це Cu-вмісні протеїни, до якої відносять діамінооксидазу (**d**iamine **o**xidase, DAO, EC 1.4.3.22), розчинну і мембранозв'язану форми семікарбазидчутливої амінооксидази (**s**emicarbazide-**s**ensitive **a**mine **o**xidase, SSAO, EC 1.4.3.21), позаклітинну лізілоксидазу (**L**-**l**ysine **o**xidase, LOX, EC 1.4.3.14) [22]. Активний центр цих ензимів містить іон міді та ковалентно зв'язаний окислювально-відновний кофактор, який у випадку SSAO та DAO представлений тригідроксифенілаланінхіноном (топахінон, TPQ), а у LOX - лізин-тирозилхіноном (LTQ). Хінонові кофактори TPQ і LTQ утворюються в активному центрі в результаті посттрансляційної модифікації залишків тирозину або лізил-тирозину, відповідно, через присутність  $\text{Cu}^{2+}$  і містять одну або дві карбонільні групи (Рис. 1.3). Це робить Cu-вмісні АОзи чутливими до семікарбазиду (SC), карбонільної «отрути», сполуки, яка здатна зв'язувати альдегіди і кетони та відома як інгібітор цих ензимів [23].



Рис. 1.2. Класифікація амінооксидаз [22].



**Рис. 1.3.** Біогенез кофактора ТОРА-хінону Cu-АОаз [23].

Всі реакції окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів за участі АОаз незалежно від приєднаного кофактора, який знаходиться в активному центрі в окисненому стані, використовують молекулярний кисень як акцептор електронів. Окислення амінів (первинних, вторинних та третинних) за присутності FAD-вмісних ензимів відбувається шляхом окисного розщеплення  $\alpha$ -СН зв'язку субстрата (Рис. 1.4). При цьому утворюється імінний продукт, тоді як флавіновий кофактор відновлюється (Рис. 1.4 (1)). Надалі імінний продукт неензиматичним шляхом гідролізується до відповідного альдегіду та аміаку (Рис. 1.4 (3)). Реокиснення флавінового коензиму для наступного каталітичного циклу здійснюється за рахунок відновлення молекулярного кисню до пероксиду водню (Рис. 1.4 (2)) [24].

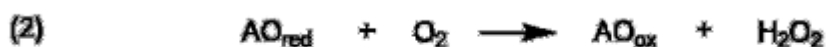
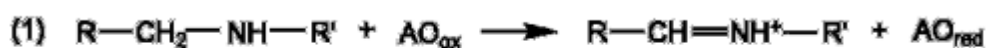
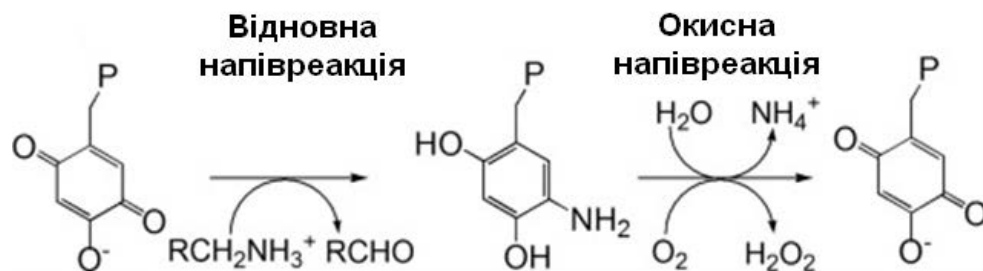


Рис. 1.4. Схема каталітичного циклу за участі FAD-АОаз. 1. Утворення імінного продукту за рахунок відновлення кофактора ензиму; 2. Реокиснення ензиму шляхом відновлення молекулярного кисню до пероксиду водню; 3. Неензиматичне вивільнення альдегіду та аміаку [24].



Каталітичний цикл для Cu-AOс складається також з двох напівреакцій, відновної та окисної, але з вивільненням продуктів в іншому порядку ніж для FAD-вмісних ензимів. На першому етапі субстрат (головним чином первинний амін) відновлює ензим з вивільненням альдегіду, а в ході другої половини циклу відбувається реокиснення ензиму за присутності молекулярного кисню та води. При цьому генеруються пероксид водню та аміак (Рис. 1.5) [23].



**Рис. 1.5.** Окисне дезамінування первинних амінів Cu-AOазами: відновна та окисна напівреакції [23].

Про фізіологічні та потенційні патогенетичні ефекти АФК та РКС йшлося у п. 1.1. Що стосується третього продукту, аміаку, то треба відмітити також його біологічну значимість та потенційну токсичність. Концентрація аміаку в крові в нормі не перевищує 50 мкмоль/л. Зростання цього показника до 100 мкмоль/л може викликати порушення свідомості, а концентрація в 200 мкмоль/л призводить до коми та конвульсій. Для підтримки гомеостазу аміаку, в організмі функціонують механізми жорсткого контролю рівнів даної сполуки, головним чином шляхом залучення до синтезу сечовини в печінці та глутаміну в місцях генерування аміаку. За умов патології може порушуватись збалансоване функціонування систем його генерування/детоксикації з наступними несприятливими наслідками для організму.

Всі представники родини АОаз характеризуються специфічною субклітинною локалізацією та субстратною специфічністю, що визначає їх індивідуальні функції та безпосередню участь у контролі важливих

клітинних, фізіологічних та патологічних процесів (Рис. 1.2). Участь окремих амінооксидаз у розвитку низки захворювань інтенсивно вивчається, а рівні активності цих ензимів використовують як клінічні маркери.

На сьогодні, інформація в літературі стосовно комплексного дослідження ролі АОаз, таких як LOX, SSAO/VAP-1, DAO та PAO у розвитку патологічних станів нирки та легені є обмеженою, як і з'ясування потенційних ефектів сполук, спрямованих на модулювання активностей цих ензимів та прояви захворювань.

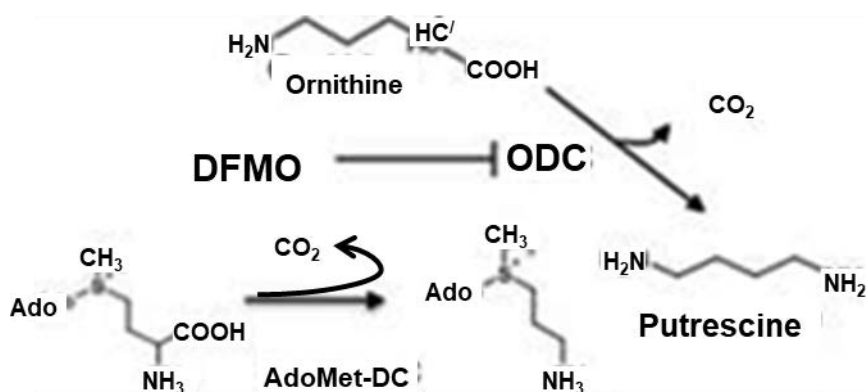
**- Поліамінооксидаза – головний регулятор  
внутрішньоклітинного вмісту поліамінів**

Поліаміни, путресцин (діамін), спермідин (триамін) і спермін (тетраамін), - низькомолекулярні аліфатичні високочаряджені полікатіони, які синтезуються з аргініну та орнітину і присутні у всіх типах клітин ссавців. Внаслідок своєї унікальної структурної особливості, регулярно розташованих позитивних зарядів, ці сполуки залучені до великої кількості клітинних процесів. Зокрема, поліаміни функціонують як антиоксиданти, оскільки здатні безпосередньо зв'язуватися з вільними радикалами та АФК, і, таким чином, нейтралізувати їх, чим забезпечується підтримка внутрішньоклітинного редокс-балансу [25]. Поліаміни також причетні до модулювання структури хроматину, транскрипції та трансляції генів, стабілізації ДНК, трансдукції сигналів, росту та проліферування клітин, міграції, стабільності мембран, функціонування іонних каналів і рецептор-лігандних взаємодій [26, 27].

В клітині поліаміни присутні в мілімолярних концентраціях, але біля 90% цієї кількості зв'язані з різними поліаніонними молекулами (головним чином ДНК і РНК). Решта, вільна частина клітинного пулу цих сполук (7-10%), доступна для негайних клітинних потреб, а, отже, підлягає жорсткому регулюванню. Цей рівень поліамінів підтримується в дуже вузькому діапазоні, оскільки зниження їх концентрації пригнічує проліферування клітин, тоді як надлишок виявляється токсичним. Тому вільний пул

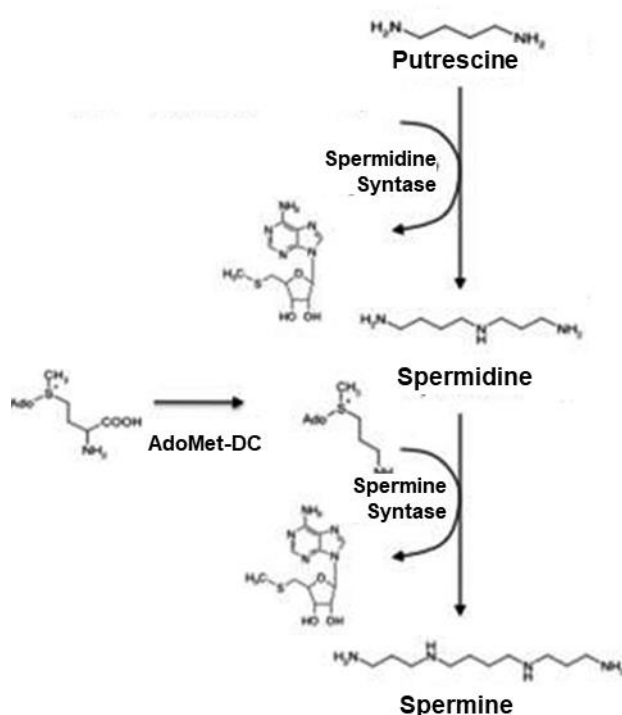
поліамінів регулюється дуже швидко, чутливо і точно та реалізується на чотирьох рівнях: синтез *de novo*, ретроконверсія, кінцева деградація та транспорт.

Синтез поліамінів відбувається починаючи з путресцину, який утворюється з орнітину за участі орнітиндекарбоксилази (ODC) (Рис. 1.6) [28].



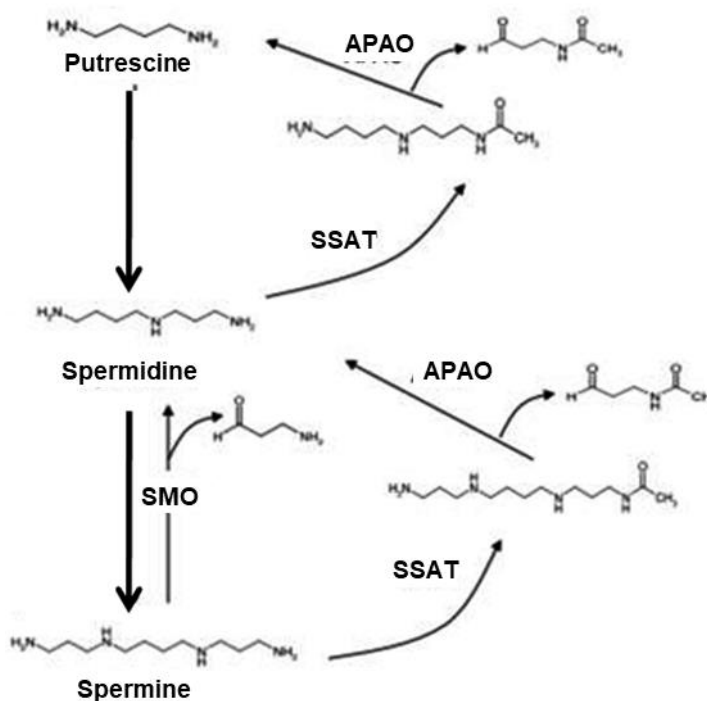
**Рис. 1.6.** Синтез путресцину: з орнітину [28].

На наступному етапі до путресцину приєднуються по черзі амінопропілові групи, донором яких є декарбоксильований S-аденозилметіонін (dcAdoMet). В даній реакції за участі спермідин/спермінсинтази послідовно продукуються вищі поліаміни, спермідин та спермін (Рис. 1.7).



**Рис. 1.7.** Синтез вищих поліамінів, сперміну та спермідину [28].

Ретроконверсія є процесом оберненим до синтезу. Перетворення вищих поліамінів у нижчі реалізується в два етапи (Рис. 1.8). На першому з них спермідин або спермін піддаються ацетилюванню в положенні  $N^1$  спермідин/спермінацетилтрансферазою (SSAT), після чого відбувається безпосередньо окисне дезамінування цих ацетильованих похідних вищих поліамінів за участі FAD-залежних амінооксидаз, поліамінооксидаз (PAO). Продуктами цих реакцій, як і інших реакцій окисного дезамінування амінів, є відповідний до субстрату аміноальдегід, пероксид водню та амоній. Аміноальдегіди, спонтанно перетворюються на акролеїн, який разом з іншим продуктом, пероксидом водню, є сильними цитотоксичними агентами, що викликають атеросклероз і міокардіальний некроз, а також є основними нефро- та нейротоксинами [29]. PAO локалізовані в пероксисомах разом з каталазою, яка, в свою чергу, контролює необхідний фізіологічний рівень  $H_2O_2$ , що генерується в реакціях окисного дезамінування ацетильованих поліамінів.

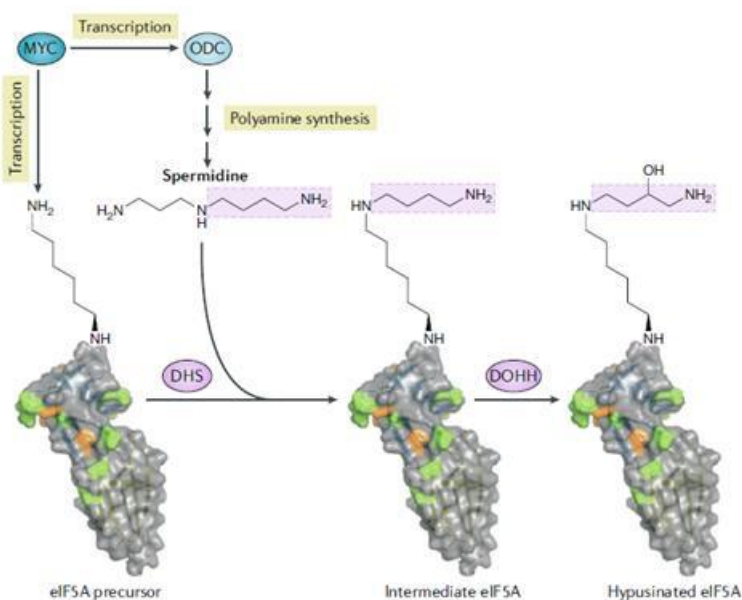


**Рис. 1.8.** Шлях ретроконверсії поліамінів [28].

Існує альтернативний шлях катаболізму сперміну до спермідину, який не потребує залучення SSAT і відбувається в один етап за присутності

сперміноксидази (SMO) в цитозолі. Це означає, що гіперактивування даного ензиму у відповідь на високі рівні сперміну за патологічних умов різного генезу буде супроводжуватись накопиченням в цитозолі цитотоксичних метаболітів, акролеїну та пероксиду водню, а враховуючи відсутність каталази в даному компартменті клітини, це може стати причиною деструктивних змін в тканинах органів-мішеней відповідних захворювань. Оскільки у людини SMO кодується геном *PAOh1*, а синтез цього протеїну стимулюється за несприятливих умов, то даний ензим можна вважати особливою, індукбельною ізоформою PAO та маркером патології [30].

Було показано, що путресцин та спермідин безпосередньо залучені до клітинного проліферування. Це пов'язано з тим, що спермідин бере участь у активуванні фактора ініціації трансляції eIF5A шляхом його пострансляційної модифікації, гіпузинізації. Спермідин є субстратом для дезоксигіпузинсинтази (DHS), а за участі дезоксигіпузингідроксилази (DOHH) eIF5A модифікується та переходить в активну гіпузиновану форму (Рис. 1.9) [31]. Активований в такий спосіб eIF5A сприяє трансляції



**Рис. 1.9.** Процес гіпузинування eIF5A та його регулювання в нормальних та пухлинних клітинах. Дезоксигіпузинсинтаза (DHS) окиснює спермідин та приєднує його до eIF5A, дезоксигіпузингідроксилаза (DOHH)

здійснює гідроксилювання інтермедіату з утворенням активної форми eIF5A [31].

протеїнів, в структурі яких присутні пролінзбагачені ділянки. Протеїни з такою структурою беруть участь у регулюванні ключових функцій росту та розвитку, зокрема стану актинового цитоскелету, сплайсингу та деградації РНК, зв'язуванні та транскрипції ДНК, а також сигналюванні. В свою чергу, спермін необхідний клітинам для підтримки життєздатності, критична втрата клітинами цього вищого поліаміну індукує апоптоз [31].

Кінцева деградація поліамінів здійснюється шляхом утилізації надлишку путресцину, який утворюється на шляху ретроконверсії вищих поліамінів і не залучається знову до циклу синтезу спермідину та сперміну. Цей путресцин окиснюється Cu-залежною діамінооксидазою (DAO).

***- Діамінооксидаза – системний регулятор функціонального стану спеціалізованих органів та тканин ссавців***

DAOази є усюдисущими ензимами та поширені від прокариотів до еукаріотів (бактерії, гриби, рослини та тварини). DAOази активні головним чином щодо коротких аліфатичних діамінів, таких як путресцин (1,4-діамінобутан), кадаверин (1,5-діамінопентан) та гістамін (2-(1H-імідазол-4-іл)етанамін).

До родини DAO ссавців належать декілька ензимів з різною локалізацією (нирки, кишечник, плацента) та субстратною специфічністю, що вказує на їх різноманітні фізіологічні функції, які іноді важко ідентифікуються і є протилежними за скеруванням. Зазначені локалізації DAOаз можуть свідчити про їх бар'єрну функцію з метою запобігання надходженню надмірних кількостей діамінів та поліамінів в організм [32].

DAO - єдиний ензим здатний контролювати ендогенні рівні гістаміну, у зв'язку з чим він відомий також як гістаміназа. Гістамін є біогенним аміном з широким спектром активностей, зокрема він залучений до реалізації запалення, секреції шлункової кислоти, нейромодулювання та регулювання

імунних функцій, що реалізується через зв'язування цього аміну з відповідними рецепторами. На сьогодні ідентифіковано 4 типи гістамінових рецепторів в: гладеньких м'язах та ендотелійних клітинах (H1), парієтальних клітинах шлунка (H2), клітинах центральної нервової системи (H3), опасистих клітинах, дендритних клітинах, еозинофілах та Т-клітинах (H4). Через потужну активність гістаміну навіть за дуже низьких концентрацій, його синтез, транспорт, зберігання, вивільнення та катаболізм підлягають жорсткому регулюванню для запобігання небажаних реакцій. Продукт окисного дезамінування гістаміну за участі DAO, імідазол-4-ацетальдегід, у свою чергу, піддається окисненню мітохондрійною альдегіддегідрогеназою, головним чином у печінці, до імідазолілетанолу або гістамінолу, які залучаються знову у метаболізм гістидину [33]. В такий спосіб, DAO виступає в організмі ссавців як модулятор імунної відповіді, а рівень активності даного ензиму в плазмі використовують в клініці як маркер загострення патології різного походження, зокрема бронхіальної астми [1]. Більш того, надходження гістаміну в організм у великій кількості з їжею може призвести до порушення його адекватної утилізації через дефіцит DAO, внаслідок чого виникає непереносимість до гістаміну, що вважається однією з можливих причин алергічних реакцій [2].

Показано також, що рівень активності DAO позитивно корелює з ростом, як в нормальних, так і в пухлинних тканинах, оскільки, як згадувалось вище, субстрат даного ензиму, путресцин, незамінний для процесів проліферування та диференціювання клітин.

Крім того, було продемонстровано, що DAO плаценти людини є ідентичною протеїну, що зв'язує діуретик амilorид, тобто, ця амінооксидаза залучена до регулювання іонного транспорту в епітелії. Припускається, що DAOази беруть також участь у деметилуванні гістонів, зокрема їх метильованих залишків аргініну. Крім цього, функціонування ензиму на даній ділянці метаболізму також вважається суттєвим через генерування пероксиду водню саме на рівні ядра клітин [32].

**- Семікарбазидчутлива амінооксидаза – ензим з плейотропним характером функціональної активності**

Рівні таких біогенних моноамінів, як саркозин, адреналін, метиламін, аміноацетон в організмі контролюються ще одним представником АОаз, SSAO. З метиламіну та аміноацетону при цьому утворюються, відповідно, формальдегід та метилгліоксаль, патофізіологічні ефекти яких добре відомі. Тобто, дисбаланс між генеруванням та катаболізмом як біогенних амінів, так і продуктів їх деградації за умов розвитку патології може бути додатковим джерелом токсичних для організму рівнів зазначених сполук та причиною ускладнень захворювання, що прогресує, а рівні активностей амінооксидаз та ензимів детоксикації продуктів катаболізму амінів та поліамінів, можуть характеризувати ступінь розвитку патології та ураження тканин органів-мішеней.

Протягом останніх десятиліть значна увага приділяється дослідженню патогенетичних аспектів гіперактивування SSAO. У ссавців цей ензим існує в двох формах: мембранозв'язаній та розчинній. Трансмембранний ензим експресується в багатьох органах і тканинах, особливо в адипоцитах, клітинах судинного ендотелію і гладеньких м'язів. В адипоцитах мембранозв'язана форма SSAO локалізована в кавеолах плазматичної мембрани разом з рецепторами CD36, які поглинають ліпіди, що вказує на причетність ензиму до контролю двоспрямованого потоку ліпідів. Крім того, в цих типах клітин SSAO знаходиться у внутрішньоклітинних везикулах разом з інсулін-чутливим транспортером глюкози GLUT4 та впливає на цей процес опосередковано через продукт реакції, пероксид водню [34, 35]. Локалізація трансмембранної SSAO в кавеолах плазматичної мембрани, які просторово зближені з кластерами сигнальних молекул, свідчить про залучення ензиму до трансдукції клітинних сигналів, найвірогідніше також за участі  $H_2O_2$ , проте залучення до цього процесу альдегідів також не виключено.

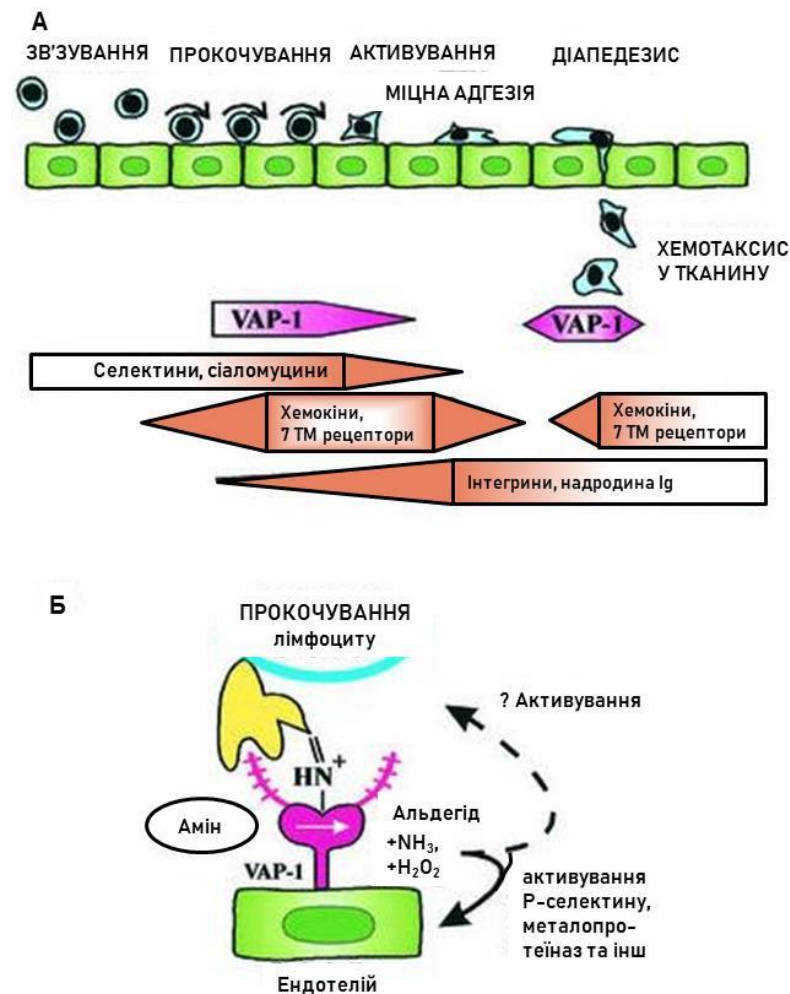


Розчинна форма SSAO циркулює в плазмі крові. Вміст ензиму в плазмі суттєво збільшується за цукрового діабету 1 та 2 типу, різних форм серцевої недостатності та цирозу печінки. Походження SSAO, що циркулює в кровообігу, залишається незрозумілим. Вважається, що можливим її джерелом є адипоцити і судинні ендотеліоцити, де мембранна SSAO за різних патологічних впливів може транслокуватися до кровообігу [36]. Таким чином, у високоваскуляризованих тканинах органів, таких як нирка та легеня, цей ензим може бути причиною патологічних змін, зокрема захворювань, серед яких гостра ниркова недостатність за рабдоміолізу, діабетична хвороба нирки та ремоделювання дихальних шляхів за бронхіальної астми.

Припускається, що скоріш за все такі деструктивні зміни пов'язані з ефектом формальдегіду, який утворюється як мембранозв'язаною, так і розчинною формою SSAO при перетворенні метиламіну і бере участь у посттрансляційних модифікаціях протеїнів, утворенні AGE та ALE, що призводить до порушення структурно-функціонального стану позаклітинного матриксу та еластичності стінок артерій [37].

SSAO відноситься до біфункційних протеїнів і, крім ензиматичної деградації первинних амінів, бере участь в екстравазуванні лейкоцитів (моноцитів) та лімфоцитів (цитотоксичних Т- та NK клітин) в місця запалення як протеїн судинної адгезії 1 (VAP-1). Механізм такої функції SSAO/VAP-1 повністю пов'язаний з каталітичною дією ензиму, принцип якої, як і для всіх інших Cu-вмісних амінооксидаз, представлений на рис. 1.5. Каскад подій, що призводить до екстравазування імунних клітин у тканини представлений на рис. 1.10А. Можливий механізм цього процесу наступний (Рис. 1.10Б). В позаклітинному домені молекули VAP-1 локалізовані олігосахаридні залишки (пурпурові відгалуження, Рис. 1.10Б), які можуть зв'язуватися з невідомою лектино-подібною молекулою (позначено жовтим кольором) на поверхні лейкоцитів. Альтернативний шлях адгезії можливий, коли ендотелійний VAP-1 використовує поверхневий амін

лейкоцитів/лімфоцитів як субстрат. Каталітична реакція призводить до утворення перехідного ковалентного зв'язку (Рис. 1.5, етап 3) між двома типами клітин. Скоріш за все, ця ензиматична реакція бере участь у зв'язуванні під час етапу ролінгу (прокочування). Зв'язування, опосередковане олігосахаридом і основою Шиффа, може залучати на обох стадіях або різні молекули на поверхні відповідних імунних клітин або одну й ту саму молекулу, якщо молекула лектино-подібного типу на поверхні лімфоцита також містить амін, субстрат для VAP-1 (Рис. 1.10Б).



**Рис. 1.10.** Каскад подій (А) та механізм (Б) адгезії лейкоцитів/лімфоцитів за участі VAP-1 [22].

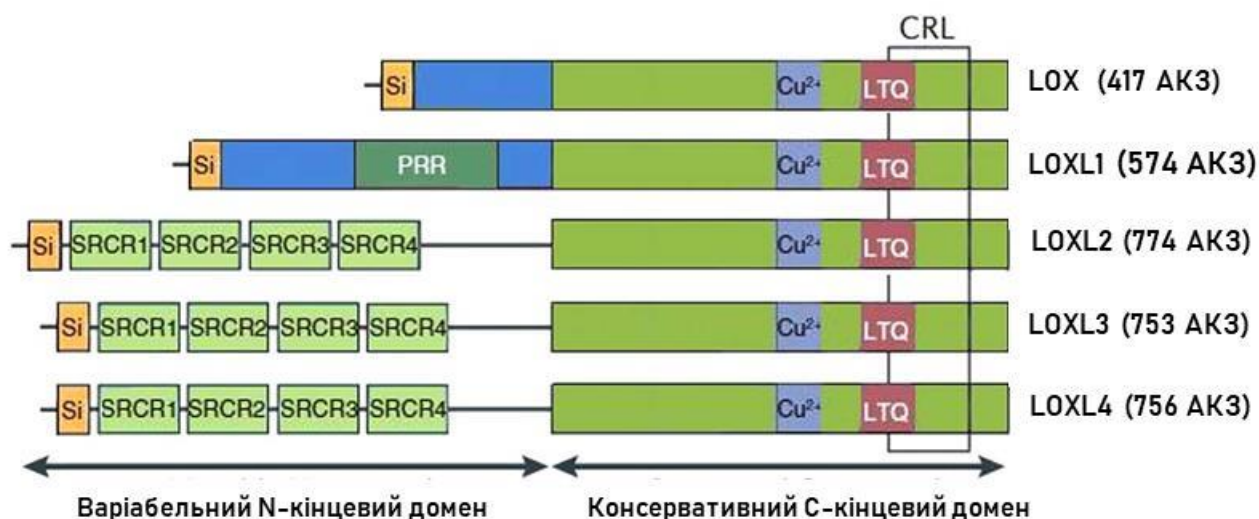
Було показано, що в ділянках запалення при захворюваннях кишечника і хронічних дерматозах має місце надекспресія SSAO/VAP-1. Даний ензим у відповідних умовах опосередковує зв'язування лімфоцитів з ендотелієм за

наведеним вище механізмом [38]. Можна припустити, що за умов хронічного запалення, яке характерне зокрема для бронхіальної астми, VAP-1 є причетним до деструкції легеневої тканини за рахунок інфільтрування до неї імунних клітин, що також потребує перевірки та підтвердження.

- *Лізілоксидази: родина багатofункційних амінооксидаз*

Лізілоксидази (LOXази) – це родина Cu-AOаз, що складається з самої LOX та чотирьох LOX-подібних (LOXL 1, 2, 3 та 4) протеїнів. Зазначені ензими каталізують дезамінування  $\epsilon$ -аміногрупи лізину в мономерах колагену та еластину, що призводить до утворення ковалентних перехресних зв'язків та стабілізації волокон цих протеїнів у складі позаклітинного матриксу (ПКМ).

LOXази характеризуються високим ступенем гомології за своєю будовою (Рис. 1.11) й містять високо консервативний С-кінцевий та варіабельний N-кінцевий домени. С-кінцева область включає центри зв'язування міді та лізілтирозилхінону (LTQ), а також домен, подібний до рецепторів цитокінів (CRL) [39, 40]. CRL перекриває каталітичний домен, і ця область за первинною структурою є подібною до N-кінцевих позаклітинних (адгезивних) ділянок рецепторів факторів росту та цитокінів. Водночас, у складі молекул протеїнів родини LOX CRL домени відповідають лише частково послідовностям рецепторів, і наразі їх повноцінна адгезивна функція остаточно не доведена. З іншого боку, різним протеїнам родини LOX притаманні відмінності саме в N-кінцевій області. LOX і LOXL1 формують окрему підродину, що містить продомен, а LOXL 2-4 містять чотири рецепторних області із збагаченими цистеїном доменами (SRCR) у своєму складі. З цими доменами пов'язують існування додаткових ензиматичних активностей. Зокрема, LOXL3 зв'язується з сигнальною молекулою Stat3 у ядрах клітин, де каталізує деацетилювання модифікованих залишків лізину [41]. З огляду на присутність великої кількості різноманітних доменів у складі молекул протеїнів родини LOX, в організмі вони можуть виконувати різні функції та брати участь у багатьох процесах.



**Рис. 1.11.** Лінійна структурна організація протеїнів родини LOX [40].

LOX, так само як і більшість біологічно активних протеїнів, секретується у вигляді попередника, пролізілоксидази, каталітично неактивного N- та O-глікозильованого проензиму з молекулярною масою ~50 кДа [42]. В його складі, як було показано, мідь і LTQ вже присутні [43-45]. Після секретування проензим піддається позаклітинному протеолітичному розщепленню за участі проколаген С протеїнази. При цьому вивільняються активна LOX і пропептид лізілоксидази (LOX-PP) [46]. Пропептид лізілоксидази (LOX-PP) має власну біологічну активність і розглядається як матрикриптин, біоактивний фрагмент ПКМ, який виявляє інші функції, ніж його батьківська молекула. В складі pro-LOX, LOX-PP необхідний для виходу молекули з ендоплазматичного ретикулула і для розташування LOX на волокнах еластину [47].

Перший етап перехресного зшивання колагену і еластину є найбільш вивченими функціями всіх представників родини LOX, що відбувається аналогічно викладеному раніше механізму для SSAO (див. п.1.2.3). Така посттрансляційна модифікація основних протеїнів ПКМ забезпечує його механічні властивості відповідно до типу тканин та стану організму, а саме міцності на розтягнення та розрив волокон колагену та еластичності волокон еластину. Окисне дезамінування за участі LOX та LOXL окремих залишків лізину та гідроксилізину в субстратах, призводить до утворення альлізину

або гідроксиальлізину, відомих також як  $\alpha$ -аміноадипінові  $\delta$ -семіальдегіди. Ці реакційноздатні альдегіди спонтанно конденсуються з іншими альдегідами або з  $\varepsilon$ -аміногрупами інших залишків лізину та гідроксилізину, утворюючи ковалентні внутрішньо- та міжмолекулярні поперечні зшивки в молекулах колагену і еластину, які є біфункційними (скоротоліві поперечні зв'язки колагену та еластину), трифункційними (зрілі колагенові поперечні зв'язки, піридиноліни, піроли та аргінолін) або тетрафункційними (зрілі поперечні зв'язки еластину такі як десмозин та ізодесмозин). І піридиноліни, і десмозини містять піридинове кільце, яке присутнє також в AGE, що опосередковує взаємодію піридиноліну з рецептором AGE [48].

Дослідженнями останніх десятиліть виявлено низку додаткових біологічних активностей ензимів родини LOX, зокрема, участь у контролі диференціювання кератиноцитів і хондроцитів, інгібування росту пухлин, сприяння метастазуванню при раку, стимулюванні проліферації та міграції клітин, а також ангиогенезу. Реалізувати зазначені функції дозволяє, як з'ясувалось, низька субстратна специфічність LOX, оскільки окрім своїх основних нерозчинних субстратів, колагену та еластину, ензим також діє на декілька розчинних субстратів, таких як фактор росту фібробластів 2 (FGF2) та трансформувальний фактор росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), інгібуючи, таким чином, передачу сигналів, що відбуваються за їх участі. Крім того, LOX окислює рецептор фактора росту з тромбоцитів (PDGF), й опосередковано через BB ізоформу PDGF регулює ріст мегакаріоцитів [49].

LOX і LOXL2 можуть поглинатися фібробластами і кератиноцитами шкіри NaCat [50]. Також доведено, що ці представники родини беруть участь у регулюванні транскрипції, оскільки LOX взаємодіє з гістоном H1, який може бути одним із його субстратів, а LOXL2 окислює триметильований лізин-4 в гістоні H3 і метильований транскрипційний фактор TAF10, який належить до комплексу TFIID, наслідком чого може бути інгібування транскрипції [51]. *LOX* і *LOXL2* є генами, контроль експресії яких регулюється фактором, що індукується гіпоксією (HIF). *LOXL3* є необхідним

для виживання клітин меланоми завдяки підтримці геномної стабільності [52].

Не зважаючи на існування множинності біологічних активностей ензимів родини LOX, основною їх функцією залишається участь у формуванні специфічної структурно-функціональної організації ПКМ. З цієї точки зору, LOXази відіграють важливу роль у розвитку, зокрема, дихальної системи та шкіри. Експресія LOX помітно зростає в фіброзних тканинах, що було підтверджено у тому числі на експериментальних моделях фіброзу шкіри, легені, печінки, а також фіброзу артерій. Крім того, було показано, що за умов патології, яка супроводжується гіперпродукуванням фібробластами колагену, наприклад субепітеліального фіброзу легеневої тканини у хворих на бронхіальну астму, даний ензим безпосередньо причетний до порушення архітекτονіки тканини органу-мішені.

У підсумку слід зазначити, що науковий прогрес у з'ясуванні біології та механізмів реалізації функціональних активностей кожної лізилоксидази без сумніву складе теоретичний фундамент, необхідний для вдосконалення терапевтичних можливостей у лікуванні як раку, так і фіброзу.

### **1.3 Високореактивні сполуки, біогенні аміни та поліаміни як регулятори та маркери патологічних станів нирки та легені**

#### **- Причетність чинників оксидативно/карбонільного стресу до розвитку гострої ниркової недостатності за рабдоміолізу**

Рабдоміоліз (*rhabdomyolysis*, from Ancient Greek *ῥάβδος* (*rhábdos*, 'rod, wand', cross-striped (англ.), поперечносмугастий, +*μυο*- м'яз, + *-lysis* - розрив) – швидкий розрив поперечносмугастої скелетної м'язової тканини, що супроводжується виділенням міоглобіну з сечею. Це складна патологія, що виникає внаслідок пошкодження цілісності скелетних м'язів під час фізичних навантажень у людей і тварин, а також внаслідок впливу окремих медикаментозних препаратів. При цьому з пошкоджених міоцитів в кров вивільняються їх внутрішньоклітинні компоненти, в першу чергу міоглобін,

який швидко з'являється в сечі хворих на рабдоміоліз. Оскільки міоглобін відомий своїм нефротоксичним ефектом, то міоглобінурія може бути маркером структурних змін нирки за даної патології [53].

Після розриву міоцитів в плазмі крові хворих з'являється лабільне (незв'язане) залізо ( $\text{Fe}^{3+}$ ), яке вивільняється з міоглобіну, що підтверджено на експериментальній моделі гліцерол-індукованого рабдоміолізу у щурів. Це негемове залізо, не зв'язане з трансферином, впливає на окисно-відновний баланс, посилюючи утворення АФК. Оксидативний стрес, що індукується за цих умов, набуває надзвичайної потужності і є характерною рисою рабдоміолізу та ще однією причиною токсичних уражень ниркової тканини, які з'являються вже протягом першої доби після пошкодження м'язів [54, 55]. Саме тому гостра ниркова недостатність (ГНН) вважається основним симптомом даної патології [56].

До розвитку патологічних наслідків рабдоміолізу залучено багато інших органів та систем, тобто це захворювання відноситься до системних за визначенням. Зокрема, за цих умов пошкодження м'язів індукує імунну відповідь та розвиток запального процесу, одним з медіаторів якого є, як відомо, гістамін, що вивільняється специфічними клітинами. Окисне дезамінування гістаміну відбувається, головним чином, в ниркових клубочках, а продукти цієї реакції, РКС та АФК, виявляють агресивний вплив на ендотелій, чим і зумовлено ураження ниркової тканини за умов нефропатії [57].

Крім того, з пошкоджених міоцитів за рабдоміолізу в кровообіг потрапляють й інші внутрішньоклітинні компоненти, креатин та саркозин - попередники ще одного біогенного аміну, метиламіну [58]. Хоча сам метиламін відносно нетоксичний, але продукти його катаболічного перетворення, формальдегід та  $\text{H}_2\text{O}_2$ , виявляють дозозалежну токсичність щодо ендотеліоцитів. Такий ефект було продемонстровано за умов експериментального атеросклерозу у мишей (хронічне введення [ $^{14}\text{C}$ ]-

метиламіну), і саме [ $^{14}\text{C}$ ]-формальдегід ставав причиною пошкодження ендотелію нирки тварин через його взаємодію з протеїнами [59].

З іншого боку, в тканинах та органах ссавців за розвитку широкого спектру захворювань, зокрема нефропатії, спостерігається зростання рівнів поліамінів. Продукти їх катаболізму, аміноальдегіди, спонтанно перетворюються на акролеїн, відомий як основний уремичний токсин [60], який може робити додатковий та досить суттєвий внесок у пошкодження ниркової тканин за ГНН.

Враховуючи викладені факти, можна припустити, що АОази, які контролюють рівні біогенних амінів та поліамінів, залучених до патогенезу ГНН за радбміолізу, також відіграють важливу роль у прогресуванні цього захворювання.

**- Причетність оксиду азоту до патогенезу діабетичної хвороби нирки**

Динаміка захворюваності на цукровий діабет (*Diabetes Mellitus - diabetes* (greek) - “a large discharge of urine” (англ.), виділення великої кількості сечі, *mellitus* (greek) - “pleasant tasting, like honey” (англ.), солодкий) в світі набуває статусу епідемії й викликає занепокоєння ВООЗ через високу вартість медичної допомоги та смертність, головним чином, від ускладнень цього захворювання. Одне з найбільш загрозливих з них, діабетична нефропатія або діабетична хвороба нирки (ДХН), яка гістологічно характеризується потовщенням базальної мембрани клубочків, збільшенням фракційного мезангіального об’єму та аномаліями подоцитів. ДХН представляє собою хронічне захворювання, що є головною причиною термінальної стадії ниркової недостатності. В сечі хворих на ранніх стадіях з’являється невелика кількість альбуміну (мікроальбумінурія), якої виявляється достатньо для токсичного впливу на нирку та індукування ДХН. Кількість альбуміну з часом збільшується й викликає ураження ниркових клубочків та втрату швидкості клубочкової фільтрації [61]. Крім того, до аномалій діабетичної нирки суттєвий внесок роблять безпосередньо сама



гіперглікемія та артеріальна гіпертензія. Таким чином, нирка є одним з головних органів-мішеней за діабету.

В той же час відомо, що до контролю всіх основних функцій нефрону, розширення як аферентної, так і еферентної артеріоли; збільшення швидкості клубочкової фільтрації, регулювання транспорту натрію вздовж різних сегментів каналців, опосередкування тиску натрійурезу, підтримки медулярної перфузії, пригнічення каналцевої клубочкової реабсорбції та модулювання активності ниркового симпатичного нерва залучений NO [62]. В ниркових ендотелії та нерві виявлено високі рівні експресії відповідних ізоформ NOS, але кількість утвореного NO позитивно корелює лише з вмістом субстрату (L-аргініну) та кофактора NOS (NADPH).

З іншого боку з'ясовано, що одним з сигнальних шляхів, які індуюються інсуліном є шлях PI3K/PKB(Akt)/eNOS/NO. За фізіологічних умов інсулін посилює продукування NO в ендотелії кровоносних судин, що призводить до їх розслаблення та посилення перфузії крові. Синтезований у такий спосіб NO виявляє також антиапоптотичну дію [63]. Проте, за умов порушення гомеостазу глюкози відбувається збій у передаванні сигналу вказаним шляхом, що, як наслідок, призводить до ендотеліальної дисфункції, яка тягне за собою розвиток гіперзапалення та тромботичного стану. Крім того, існують дані, що за діабету порушення функціонування eNOS (uncoupling eNOS) призводить до посилення продукування АФК замість NO та загострення ДХН [64].

З огляду на вищесказане, велика увага дослідників наразі приділяється вивченню функціонування системи NO за умов діабету. На сьогоднішній день накопичено великий обсяг даних з цього питання, та, на жаль, більшість з них є суперечливими. Згідно одних повідомлень, діабет запускає механізми, які одночасно як посилюють, так і пригнічують біодоступність NO в нирці, і на ранніх стадіях нефропатії баланс між цими двома протилежними процесами зміщується в бік зростання рівня NO, що сприяє гіперфільтрації та мікроальбумінурії, характерних ознак ранньої діабетичної нефропатії.

Водночас, за хронічної гіперглікемії паралельно із накопиченням AGE спостерігається зниження біодоступності NO, що призводить до важкої протеїнурії, зниження функції нирки і гіпертензії [65]. Інші експериментальні дані, навпаки, підтверджують підвищене продукування NO і ONOO<sup>-</sup> в тканинах тварин, хворих на цукровий діабет [66]. Такі протиріччя зумовлені, головним чином, технічними труднощами у вимірюванні рівнів NO та його похідних в тканинах людини та піддослідних тварин, оскільки NO є нестабільною молекулою, яка трансформується до (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) або утворює комплекси з гемовим та негемовим Fe<sup>2+</sup> протягом секунд. Однозначну відповідь у даному випадку може дати лише пряме вимірювання NO, яке, як і для інших вільнорадикальних сполук, можливе лише за допомогою ЕПР спектроскопії або амперометричних електродів.

З вищевикладеного зрозуміло, що шляхи генерування АФК та АФА тісно пов'язані, зокрема й за хронічної гіперглікемії. З іншого боку, на сьогоднішній день остаточно доведено, що діабет характеризується високими рівнями АФК і РКС, які спричиняють виникнення ускладнень даної патології [67, 68, 69]. Це дає підстави зробити припущення, що за розвитку діабетичного стану в організмі існує взаємозв'язок між функціонуванням АОаз, як одного з джерел потужного оксидативно/карбонільного стресу, та обміном АФА. Крім того, надзвичайно актуальним є з'ясування внеску потужності оксидативного, карбонільного та нітрозативного стресу до патогенезу ДХН. Наразі такі дані відсутні, і тому вирішення поставлених питань потребує їх подальшого вивчення.

#### **- Характеристика патогенезу бронхіальної астми та фіброзу легені**

Бронхіальна астма (з грец. *ασθμα*, *asthma* – «задишання») – це хронічне захворювання дихальних шляхів, яке призводить до ураження легені. В основі прояву симптомів астми, що повторюються, таких як стійкий кашель, посилена секреція слизу і свистяче дихання, лежать патофізіологічні процеси пов'язані з гіперактивністю дихальних шляхів (підвищена чутливість до будь-яких фізичних та хімічних впливів), їх запаленням та, насамкінець,

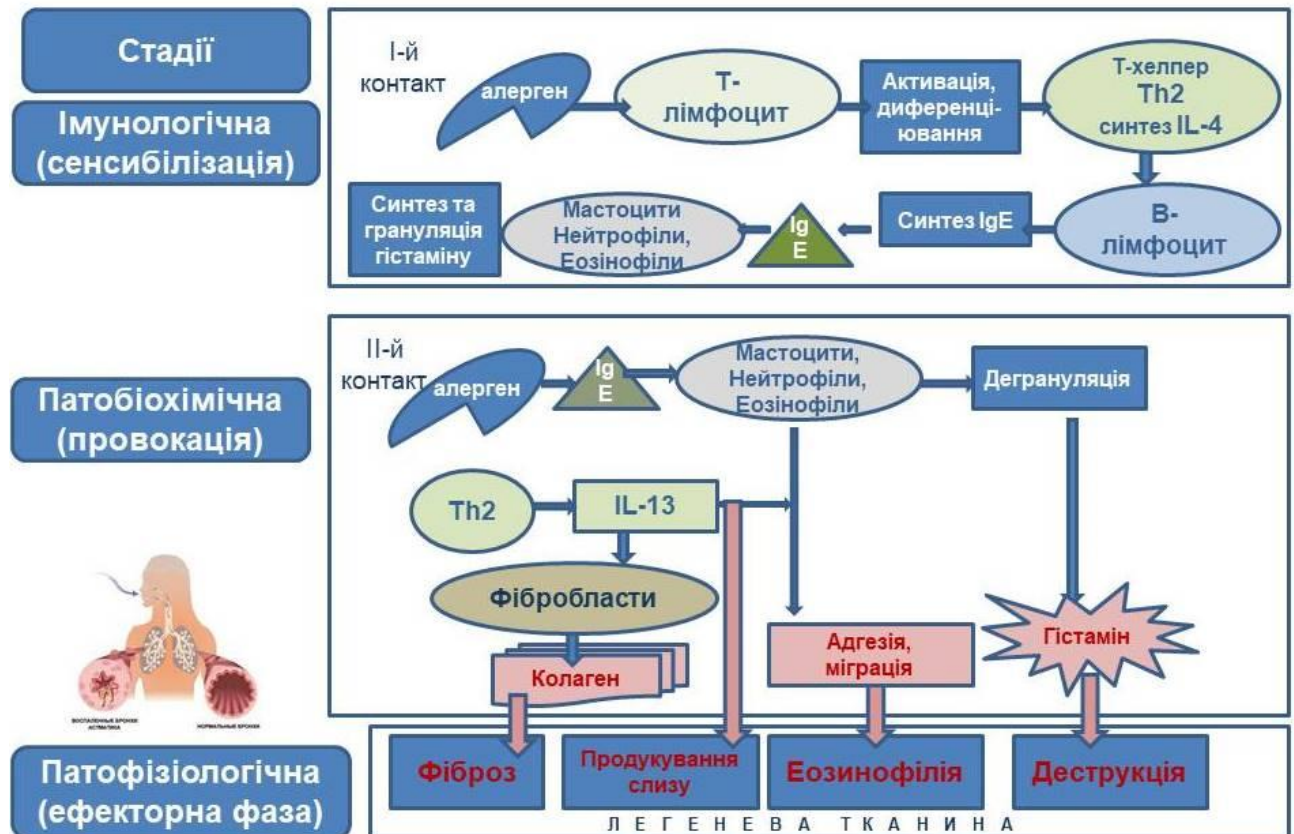
ремоделюванням. Метаплазія епітелійних залозистих клітин, потовщення гладеньких м'язів та субепітелійний фіброз є проявами такої структурної перебудови тканини дихальних шляхів [70].

Незважаючи на те, що механізми, які лежать в основі розвитку патологічних проявів астми, досить активно вивчаються, з'ясовано та ідентифіковано більшість її чинників, а також розроблено низку достатньо ефективних терапевтичних підходів, деякі аспекти перебігу цього захворювання залишаються недостатньо дослідженими. Зокрема, це стосується біохімічних аспектів обміну біогенних амінів, які причетні до запальних процесів, хоча ця ланка метаболізму може відігравати важливу роль у розвитку патологічного процесу і бути однією з причин його негативних наслідків.

Патогенез астми пов'язаний з різними чинниками. На першому місці стоїть алергічна реакція організму, тобто реакція гіперчутливості I типу, розвиток імунної відповіді організму на вторгнення алергену, специфічного протеїну у надзвичайно низьких концентраціях. В подібних випадках імунні клітини організму, В-лімфоцити, виробляють антитіла (імуноглобуліни, Ig). Специфічними до алергенів є імуноглобуліни класу E (IgE), які постійно присутні в крові у надзвичайно низьких концентраціях, тоді як за умов розвитку алергічної реакції запускається складний каскад подій (Рис. 1.12) за участі імунних клітин та медіаторів запалення, що призводить до суттєвого зростання їх рівня [71].

Наприкінці 1980-х років було відкрито окрему субпопуляцію Т-лімфоцитів CD4+, хелперних Т-лімфоцитів 2-го типу (Th2), які продукують цитокіни IL-4 і IL-13, залучені до регулювання патогенезу астми, що було доведено на багатьох тваринних моделях та у клінічних дослідженнях [72]. Незважаючи на те, що IL-4 і IL-13 кодуються спорідненими генами (chr5q у людини і chr11 у мишей), мають низку спільних регуляторних елементів (GATA-3) і передають сигнали через спільний функціональний рецепторний комплекс (IL-4R $\alpha$ /IL-13R $\alpha$ 1), в розвитку алергічної астми вони виявляють

різні функції, що було продемонстровано в експериментах *in vivo* з використанням нокаутних за відповідними генами мишей. Так, IL-4 відіграє важливу роль в ініціації алергічних реакцій дихальних шляхів і гуморальній відповіді, тоді як IL-13 регулює пізню ефektorну стадію розвитку бронхіальної астми [73].



**Рис. 1.12.** Узагальнена схема патогенезу atopічної бронхіальної астми (реакція гіперчутливості I типу) [71].

Таким чином, на стадії ініціації алергічної реакції (сенсibilізації до певного чужорідного протеїну, Рис. 1.12) відбувається контакт Т-хелперних клітин з алергеном, зв'язаним з головним комплексом гістосумісності клітин, що презентують антиген, та відповідна активація наївних Т-лімфоцитів, внаслідок чого запускається генерування IL-4 та зсув диференціювання цих клітин у бік Th2. Активовані Th2 клітини, в свою чергу, активують В-клітини, що виробляють IgE. Внаслідок збільшення концентрації цих антитіл посилюється експресія їх рецепторів на опасистих клітинах, базофілах та еозинофілах. Всі ці клітини містять низку сполук, цитокінів та медіаторів

запалення, і, насамперед, гістаміну, який разом з іншими сполуками подібної дії вивільняється у кров'яне русло у відповідь на активацію цих клітин після зв'язування з IgE в комплексі з алергеном.

Під час наступного (вторинного) контакту з алергеном (провокація, Рис. 1.12) відбувається його зв'язування одночасно з двома антитілами IgE на поверхні опасистих клітин або базофілів. При цьому рецептори сусідніх IgE виявляються перехресно зшитими. Наслідком активації подібним чином гістамін-вмісних клітин є процес їх дегранулювання, тобто розрив внутрішньоклітинних гранул з повним вивільненням прозапальних медіаторів. Таким чином, після дегранулювання мастоцитів в крові багаторазово збільшується концентрація цитокінів (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13), гістаміну, триптази, лейкортієнів та простагландинів, які є регуляторами важливих фізіологічних процесів: секретування слизу, стимулювання нервів, розширення судин та скорочення гладеньких м'язів. Крім того, прозапальні медіатори активують експресію епітелійними клітинами молекул для адгезії запальних клітин, що задіяні у розвитку atopічної реакції (еозинофілів, базофілів, опасистих клітин та лімфоцитів), а триптаза через активацію PAR-2 (протеїназа активованого рецептору-2) сприяє проникності судин для тих самих лейкоцитів. Всі ці процеси разом призводять до інфільтрування у дихальні шляхи запальних клітин та вивільнення ними там цитокінів та гістаміну, що викликає скорочення бронхів. Хронічне запалення призводить до ураження дихальних шляхів та розвитку їх гіперреактивності (підвищена чутливість до хімічних механічних та термічних подразників) [74].

Показано, що в тканині легені, епітелії бронхів та плазмі крові хворих на бронхіальну астму на стадії загострення хвороби рівні гістаміну, серотоніну та катехоламінів (дофаміну, норадреналіну та адреналіну) перевищують фізіологічні на декілька порядків.

На пізніх стадіях імунної алергічної відповіді (Рис. 1.12), Th2-клітини синтезують цитокін IL-13 задіяний у регулюванні ефекторної фази atopічної астми, а саме, сприяє гіперреактивності дихальних шляхів, продукуванню

слизу, зміні морфології гладеньких м'язів дихальних шляхів та субепітеліальному фіброзу [75]. Така участь IL-13 у процесі ремоделювання дихальних шляхів обумовлена індукуванням синтезу TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Вивільнення медіаторів запального процесу за бронхіальної астми викликає порушення функцій та апоптоз епітеліальних та ендотеліальних клітин легені, які при цьому набувають фенотипових властивостей мезенхімальних клітин (міофібробластів та фібробластів) завдяки процесу, відомому як епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП). Фібробласти, що активно проліферують, секретують компоненти ПКМ у надлишковій кількості, що призводить до утворення потовщень міжальвеолярних перетинок легені, тобто розвитку пульмонологічного фіброзу (Рис. 1.12).

З іншого боку, експериментально доведено, що за розвитку бронхіальної астми спостерігається збільшення концентрації NO, який діє як нейротрансмітер для неадренергічних, нехолінергічних нервів та виявляє антимікробну, імунологічну та протизапальну дію. Клітини легені містять високі рівні NOS, а NO за фізіологічного стану присутній у повітрі, що видихується. За умов розвитку алергічної реакції еозинофільне запалення супроводжується підвищеним вмістом NO і корелює з іншими маркерами запального процесу. Кількість NO збільшується у хворих під час загострення бронхіальної астми і зменшується на стадії її ремісії. В тканинах хворих, за надмірні рівні NO відповідає iNOS. Оскільки вміст NO у повітрі, що видихується, не збільшується під час бронхоспазму за відсутності співіснуючих запалень, він може слугувати для диференціювання запальних і бронхоспастичних компонентів за астми [76].

Згідно чисельних експериментальних даних, ендогенні та екзогенні АФК та індуковані ними АФА (зокрема ONOO-) відіграють одну з основних ролей в запаленні дихальних шляхів та є детермінантами тяжкості перебігу астми, оскільки ці реактивні сполуки генеруються активованими нейтрофілами, еозинофілами та опасистими клітинами у надмірній кількості. При цьому в осередки запалення легені та дихальних шляхів відбувається

інфільтрування цих імунних клітин, що стає причиною деструктивних змін тканин органу-мішені захворювання.

Згідно сучасної моделі оксидативного стресу, високі рівні АФК викликають активування низки чинників: 1) фактора транскрипції Nrf2, який кодує понад 200 генів, що відповідають за продукування широкого кола антиоксидантів та поліамінів, відомих своєю антиоксидантною дією; 2) протеїнкінази, що активується мітогенами (MAP-кінази) і ядерного фактора NF- $\kappa$ B з наступною експресією запальних цитокінів, хемокінів та адгезійних молекул; 3) запускається цитотоксична відповідь, яка призводить до апоптозу або некрозу [77].

З огляду на вищеописані прояви системного захворювання, бронхіальної астми, і його окремої складової, фіброзу легені, до розвитку яких безпосередньо залучені як біогенні аміни та поліаміни, так і продукти їх катаболічного перетворення, вивчення причетності АОаз до патогенезу захворювань легені є актуальним завданням сучасної біохімії та експериментальної медицини.

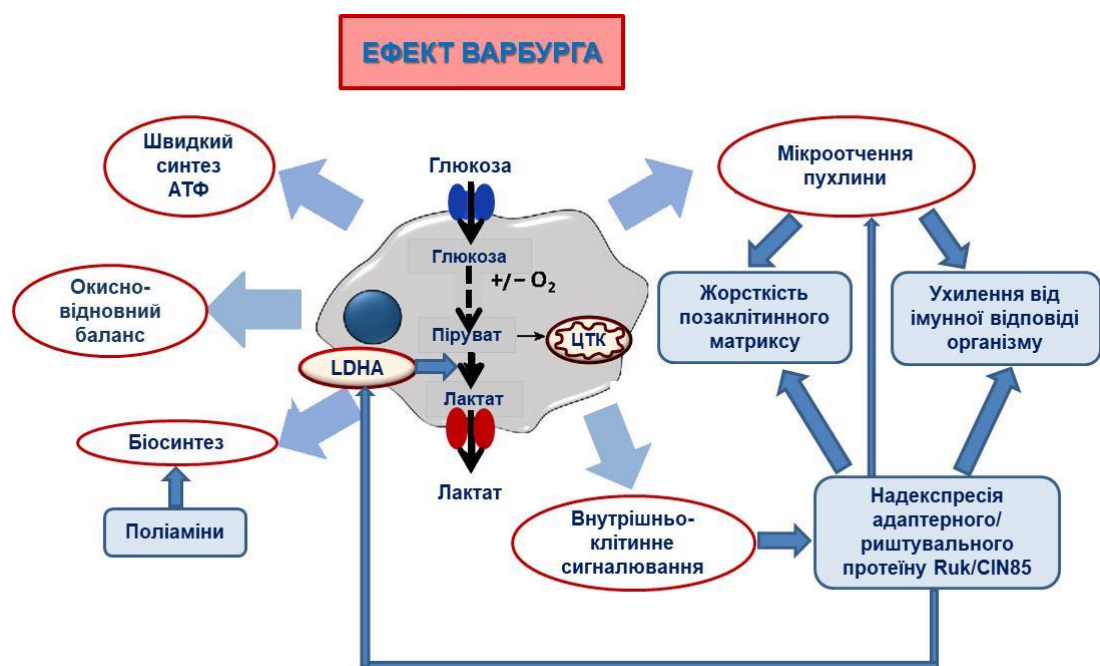
#### ***- Метаболічний контроль агресивності пухлинних клітин***

Одним з гострих питань сучасної медицини та біохімії, безумовно, залишається проблема подолання онкологічних захворювань, оскільки чи не найбільший відсоток поганих прогнозів при цьому пов'язаний з прогресуванням раку, набуттям пухлинними клітинами резистентності до хеміотерапевтичних агентів та підвищенням їх метастатичного потенціалу.

Ці процеси, головним чином, тісно пов'язані з розвитком агресивного фенотипу пухлин, в основі чого лежить перетворення неінвазивних ракових клітин у пухлинні клітини, подібні до стовбурових (cancer stem cells, CSCs), що запускається перепрограмуванням пухлинних клітин у процесі зворотного епітелійно-мезенхімного переходу (ЕМП) [78]. Визначальними чинниками, що зумовлюють виникнення і наступне функціонування CSCs є генетично і епігенетично детерміновані порушення у регулюванні

сигнальних та метаболічних мереж, залучених до контролю їх виживання та самовідтворення [79].

Набуття/втрата ознак злоякісності раковими клітинами тісно корелює з їх метаболічним репрограмуванням, відомим як ефект Варбурга. Більше ніж 100 років тому Отто Варбург виявив здатність ракових клітин метаболізувати глюкозу способом, відмінним від метаболізму глюкози у нормальних клітинах. Цей феномен полягає у ферментуванні глюкози до лактату за фізіологічних значень парціального тиску молекулярного кисню, завдяки чому відомий також як аеробний гліколіз (Рис. 1.13).



**Рис. 1.13.** Схематичне зображення ефекту Варбурга та його зв'язку з біоенергетикою, біосинтезом, сигналюванням та мікрооточенням пухлинних клітин.

Висока швидкість росту та поділу пухлинних клітин вимагає інтенсивного поглинання глюкози та її ферментування, яке полягає у перетворенні пірувату в цитозолі на лактат за участі лактатдегідрогенази (LDH) з подальшим секретуванням лактату у мікросередовище пухлини. Однак, навіть за умов наявності достатньої кількості кисню в тканині, в ракових клітинах кількість утвореного пірувату та його окислення в



мітохондріях (OXPHOS) не пов'язані між собою, тобто відбувається роз'єднання гліколізу і циклу трикарбонових кислот (ЦТК). Підвищене споживання глюкози призводить до утворення великої кількості різноманітних проміжних метаболітів гліколізу, які частково можуть бути використані в спряжених біосинтетичних шляхах з утворенням ключових блоків для синтезу біомаси (амінокислот, нуклеїнових кислот та ліпідів). В свою чергу, високі рівні енергії та анаболічних метаболітів гальмують ЦТК за принципом негативного зворотного зв'язку шляхом як алостеричного пригнічення піруватдегідрогеназного комплексу (PDC), так й активування кінази піруватдегідрогенази (PDK), з наступним інактивуванням PDC. Крім того, онкогенні сигнали через ковалентні модифікації PDC також пригнічують швидкість OXPHOS. Таке роз'єднання гліколізу та ЦТК дозволяє раковим клітинам ефективно споживати глюкозу для біосинтетичних і біоенергетичних потреб. Таким чином, метаболічний фенотип Варбурга є ознакою, пов'язаною з прогресією пухлинного росту, оскільки задовольняє анаболічні потреби клітин, що діляться [80].

На сьогодні встановлено, що ефект Варбурга крім гліколізу охоплює низку спряжених метаболічних шляхів, таких як підтримання редокс-балансу, енергетичних потреб, обмін поліамінів та ін (рис.1.13) [81].

В пухлинах різного тканинного походження (рак молочної, передміхурової, підшлункової залоз, колоректальний рак, рак шкіри та інші) метаболізм поліамінів добре вивчений й доведено його участь у канцерогенезі [82]. Більш того, рівні поліамінів та продукти їх катаболізму в сечі та плазмі пропонують використовувати як біомаркери виникнення та прогресування пухлинного посту [27].

Однією з мішеней транскрипційного фактора, онкогену MYC, як у нормальних, так і в неопластичних клітинах, є ключовий ензим синтезу поліамінів, ODC. Мішенями MYC також є компоненти рибосом, тРНК, а також фактори ініціації та елонгації трансляції, а саме ізоформа 1 фактора ініціації трансляції еукаріотів 5A (eIF5A), активація якого, як згадувалось

раніше, відбувається шляхом його посттрансляційної модифікації дезоксигіпузином, похідним спермідину [31]. Поліамін путресцин також може сприяти синтезу протеїнів через його вплив на комплекс mTORC1 і евкаріотичний фактор ініціації трансляції 4E (eIF4FE). Крім того показано, що для агресивних субклонів пухлинних клітин меланоми та прямої кишки надзвичайно токсичними є продукти катаболізму саме вищого поліаміну сперміну, пероксид водню та 3-амінопропаналь, який спонтанно метаболізується до акролеїну, відомого своєю цитотоксичністю [83].

На сьогодні встановлено, що метаболічні ензими в ракових клітинах виявляють як каталітичну, так і транскрипційну активності. Вони не тільки стимулюють та підтримують метаболічні характеристики, але й здатні також активувати стовбурово-подібні властивості клітин як на рівні транскрипції, так і на рівні інтегрування внутрішньоклітинного проходження сигналів у мережі регуляторних механізмів [84]. Сказане дозволяє використовувати ці молекули одночасно як маркери для виявлення CSCs, так і як потенційні мішені в розробці засобів для лікування ракових захворювань. Зокрема, до таких регуляторів відносять ензими, що контролюють аеробний гліколіз, біоактивні ліпіди та відповідні ензими, що каталізують їхнє утворення, а також ензими, які відповідають за формування структурно-функціонального стану ПКМ, та ензими, асоційовані з метаболічним адаптуванням в CSCs [84].

Як вже згадувалось, накопичення генетичних та епігенетичних змін є ознакою раку, а не виправлені пошкодження ДНК, що виникають у результаті впливу АФК, можуть призводити до накопичення мутацій в так званих генах-драйверах, які сприяють канцерогенезу. Під час хронічного запалення виникає  $H_2O_2$ -опосередковане пошкодження ДНК, що також сприяє епігенетичним змінам таким, як метилювання ДНК та модифікації гістонів, що, в свою чергу, призводить до пригнічення експресії генів-супресорів пухлин [85].

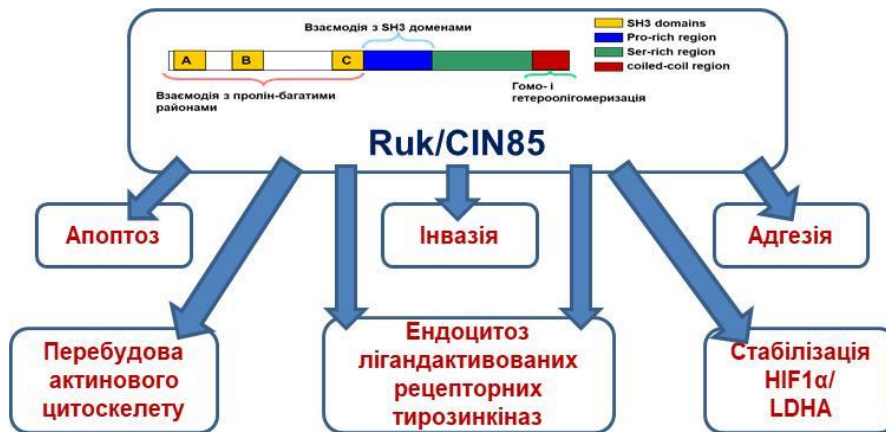
Крім того, ступінь агресивності пухлинних клітин взаємопов'язаний також з їх редокс-балансом. Високоінвазивні клітини характеризуються підвищеними рівнями АФК та мають потужний антиоксидантний статус, що регулюється відповідними високими рівнями експресії транскрипційного фактора Nrf2 [86].

Одними із основних компонентів сигнальних мереж клітин є адаптерні/риштувальні протеїни, які не мають каталітичної активності і характеризуються наявністю численних протеїно-/ліпід-зв'язувальних доменів і мотивів, а також центрів для індукованого посттрансляційного модифікування, що дозволяє їм функціонувати як молекулярні платформи в процесі обробки сигналів і одночасно сегрегувати індивідуальні сигнальні комплекси [87]. У багатьох випадках адаптерні/риштувальні протеїни є необхідними для повної активації сигнальних шляхів. Вони визначають утворення і локалізацію сигнальних комплексів і можуть сприяти проходженню чи інгібувати передачу сигналу залежно від їх концентрації в певному компартменті, регулюючи, таким чином, специфічність, ефективність і амплітуду сигналювання [88]. Зважаючи на важливу роль адаптерних протеїнів у процесингу клітинних сигналів, цілком ймовірно, що порушення у їх функціонуванні може бути залученим до канцерогенезу.

Адаптерний/риштувальний протеїн Ruk (**R**egulator for **u**biquitous **k**inase – у гризунів) [89] та CIN85 (**C**bl-**i**nteracting protein of **85K** – у людини) [90], надалі Ruk/CIN85, належить до еволюційно консервативної родини SH3-вмісних протеїнів [91]. Представники цієї родини характеризуються наявністю трьох SH3 доменів на N-кінці молекули (A, B and C), центрального пролін-багатого району, що містить чотири блоки атипових пролін-багатих мотивів, та C-кінцевого суперспіралізованого домену (Рис. 1.14).

З часу ідентифікування Ruk/CIN85 у 2000 році було виявлено, що він відіграє важливу роль у безлічі процесів, пов'язаних з канцерогенезом, такими як перебудова актинового цитоскелету, адгезія клітин та інвазія [92, 93], апоптоз [89, 94], мітогенне сигналювання [95], ліганд-індукований

ендоцитоз мембранних рецепторів і трафік везикул [96]. Попередні дослідження, зокрема ті, що проведені у відділі сигнальних механізмів клітини, продемонстрували, що високий рівень експресії Ruk/CIN85 в аденокарциномних клітинах грудної залози людини лінії MCF-7 та миші лінії 4T1 супроводжується їх малігнізацією, посиленням хіміорезистентності та набуттям ознак CSCs [97-99].



**Рис. 1.14.** Будова і функції адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

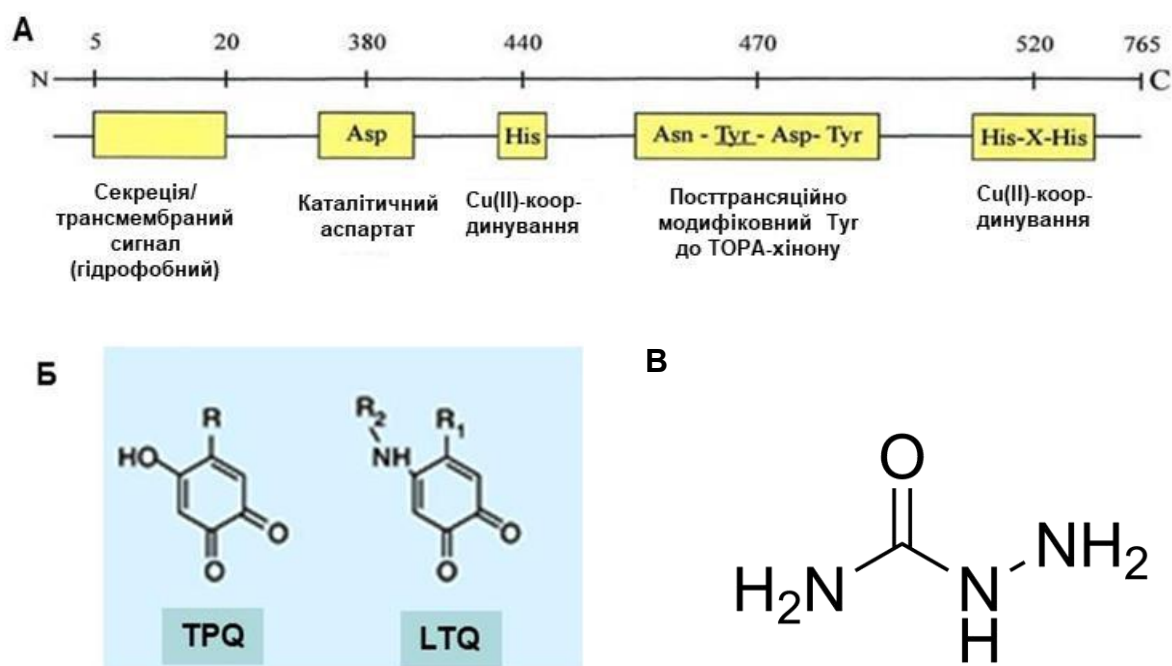
Молекулярні стратегії, за допомогою яких можна впливати на реверсію специфічного пухлинного фенотипу і різні стадії метастазування через контроль метаболічного репрограмування пухлинних клітин, залишаються поки що мало з'ясованими. Використання зразків пухлин пацієнтів не дозволяє в повній мірі проаналізувати механізми, залучені до підтримання EMP та формування CSCs, оскільки події трансформації в пухлинних клітинах вже відбулися. З цією метою у відділі були створені унікальні моделі пухлинних клітин з up-/down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Однак, на сьогодні у літературі повністю відсутні дані стосовно ролі Ruk/CIN85 у метаболічному репрограмуванні пухлинних клітин й переходу до аеробного гліколізу, необхідному для підтримання функційної активності CSCs. Враховуючи важливу роль АОаз, їх субстратів і продуктів у прогресуванні онкологічних захворювань, з'ясування регуляторної

взаємозалежності між зазначеними ланками потребує комплексного дослідження.

#### 1.4. Скавенджери реактивних карбонільних сполук як потенційні терапевтичні агенти

Окремим напрямком біомедичних досліджень останніх десятиліть є пошук сполук для корегування патологічних станів, що супроводжуються карбонільним стресом [100]. Зокрема це стосується дизайну і розробки селективних інгібіторів таких потенційних терапевтичних мішеней як Cu-АОази [101]. Згідно даних літератури, викладених в п. 1.2, стосовно структури, будови активного центру та каталітичних властивостей цих ензимів (Рис. 1.15 А, Б), всі вони є чутливими до дії такого акцептора альдегідів, як семікарбазид (рис. 1.15.В). Беручи до уваги, що за умов розвитку низки патологічних станів спостерігається надмірне активування всіх представників родини Cu-АОаз, застосування їх спільного інгібітора, як



**Рис. 1.15.** Лінійна структурна організація мідь-вмісних амінооксидаз (А [22]), хімічна структура хінонових кофакторів (2,3,5-тригідроксифенілаланін/ТОРА-хінон/TPQ, лізин-тирозилхінон/LTQ) (Б) та семікарбазиду (В).

сполуки, здатної взаємодіяти з двома або більше мішенями, сприятиме отриманню синергічних клінічних ефектів з одночасним зменшенням ризиків та відсутністю відповідей, пов'язаних з комбінуванням кількох препаратів [102].

SC є представником класу гидразинів, що здатні акцептувати альдегіди. У медицині ця речовина застосовується як протипухлинний (SC-Cd) агент, антибактерійний засіб (нітрофурані), протизапальний засіб, знеболювальний засіб, агент судинної терапії, компонент засобів від ожиріння.

Крім того, SC використовують також в:

- хімічній промисловості (виробництво пестицидів, вулканізація гумових виробів, виробництво поліетилену для харчових упаковок і одноразового посуду, у виробництві фільтрів для сигарет);
- тваринництві (санітарна обробка стоків тваринницьких комплексів, ветеринарія);
- птахівництві (обробка яєць, яка призводить до присутності в жовтку до 75% від застосованого для цієї процедури семікарбазиду);
- бджільництві (дезинфекція вуликів),
- рибному господарстві (очищення і фільтрування води),
- харчовій промисловості (відбілювач борошна, розпушувач тіста, антибактерійна обробка яєць, природний компонент морепродуктів);

Таким чином, SC може потрапляти в організм людини і тварин різними шляхами (з їжею, водою, медикаментами). Термообробка продуктів, що містять SC, перед вживанням майже не впливає на концентрацію цієї сполуки в них. В експериментах *in vivo* встановлено, що введення різних доз SC інтактним тваринам призводило до індукування низки патологічних станів та захворювань:

- онкологічних (фібробластоми молочної залози, яєчників),
- латиризму,
- крововиливів у мозку, печінці, кишечнику,
- зниження життєдіяльності,

- смерті ( $LD_{50} = 225$  мг/кг ваги гризунів).

Як видно з вищевикладеного, ця сполука виявляє діаметрально протилежні ефекти на організм, від лікувальних до таких згубних як канцерогенність і генотоксичність, причина яких не до кінця зрозуміла. З 1995 року в Євросоюзі обмежено застосування нітрофуранів, а з 2005 року контролюється використання SC у виробництві поліетилену. Тим не менш, залишається ще велика кількість можливостей проникнення цієї сполуки в організм, перш за все тому, що вона є природним компонентом всіх без винятку морепродуктів. Враховуючи високу вірогідність потрапляння SC в організм людини та тварин, логічно припустити, що у них має існувати захисна система від потенційної токсичності цієї речовини. Головним органом детоксикації ксенобіотиків є печінка. Наразі в літературі відсутні відомості про цитотоксичну дію SC, тому важливою видається необхідність дослідження причин та меж токсичності цієї сполуки з метою застосування *in vivo* як потенційного терапевтичного агенту, а також при вивченні залучення Cu-АОаз до патогенезу захворювань, які супроводжуються їх надмірним активуванням.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Моделі *in vivo*

##### - *Тварини*

У дослідженнях використовували самців щурів лінії Wistar віком до 2 місяців вагою приблизно 120 г та безпородних самців-мурчаків вільних від специфічних патогенів (SPF) вагою 300-350 г. Тварини утримувались у стандартних лабораторних умовах у клітках з полістиролу: вони отримували охолоджену до 20-21°C кип'ячену воду та харчування у формі гранульованого комбінованого корму *ad libitum*. Мурчаки додатково отримували стерилізоване сіно, суміш цільних зернових (пшениця, горох, овес, насіння соняшника) та свіжі овочі (морква та капуста). Експериментальні дослідження проводили відповідно до Закону України "Про захист тварин від жорсткого поводження" (№ 3747-IV від 21.02.2006), Методичних рекомендацій про використання тварин у біомедичних дослідженнях [103], із дотриманням етичних норм Директиви № 86/609/ЄС. В експерименті використовували анестетики: ефір, нембутал, тіопентал натрію та лідокаїн.

##### - *Модель гліцерол-стимульованого рабдоміолізу*

Тварин у довільному порядку було розподілено на 4 групи по 6 у кожній. Щури в групі «Контроль» були інтактними. Щурам у групах «Рабдоміоліз-1», «Рабдоміоліз-3», «Рабдоміоліз-6» вводили 50% водний розчин гліцеролу (10 мл/кг, в/м в задню поверхню стегна обох кінцівок). На 1-й («Рабдоміоліз-1»), 3-й («Рабдоміоліз-3») та 6-й («Рабдоміоліз-6») дні після ін'єкції гліцеролу тварин виводили з експерименту під легким ефірним наркозом. Тканини тимусу та нирки забирали для подальших досліджень [104].

##### - *Експериментальна модель стрептозотоцин-індукованого діабету 1 типу*

Діабет 1 типу індукували введенням щурам селективного для  $\beta$ -клітин



панкреатичних острівців токсину стрептозотоцину (STZ) за протоколом, описаним в: [105]. Оскільки щури лінії Wistar не схильні до розвитку автоімунних захворювань, використання цих тварин та описаного нижче способу введення STZ дозволяє уникнути незворотного пошкодження панкреатичних острівців, а також токсичного впливу на регіональні стовбурові клітини та пригнічення регенеративних процесів в підшлунковій залозі, зберігаючи при цьому можливість регулювання пошкоджень цього органу.

Експеримент, в якому використовували 15 тварин, проводили в 2 етапи. 5 тварин залишили як контрольну групу (інтактні тварини) [105].

Етап 1: Моделювання цукрового діабету 1 типу (група «Діабет») здійснювали у 10 тварин потрійним внутрішньочеревним (в/ч) введенням STZ в різних дозах в 0,5 мл цитратного буферу (рН 4,5) з інтервалом у 7 днів. Для першої та третьої ін'єкцій кількість препарату, що підлягає введенню, становила 25 мг/кг маси тіла тварини, тоді як для другого введення - 20 мг/кг. Кожне введення проводили під легким ефірним наркозом після 12 год голодування. Неповний ад'ювант Фройнда (1 мл) вводили в/ч за 1 день до введення STZ. Через 7 днів після останньої ін'єкції STZ визначали рівень глюкози глюкометром ("Глюкофот Плюс", Україна) у зразках крові, зібраних з хвостової вени ампутацією кінчика хвоста. Цей показник у щурів з діабетом становив  $(27,0 \pm 8,0)$  мМ, тоді як у інтактних щурів (група «Контроль») –  $(6,5 \pm 1,7)$  мМ. Надалі діабетичних тварин було поділено на 2 групи приблизно з однаковим рівнем глюкози в крові, по 5 тварин у групі. Одну групу залишали (Діабет), іншу групу використовували на етапі 2 експерименту [105].

Етап 2: Моделювання діабету, ускладненого рабдоміолізом (група «Діабет+рабдоміоліз»), здійснювали 5 діабетичним щурам (друга група див. етап 1), яким індукували рабдоміоліз в/м введенням 50% водного розчину

гліцеролу (10 мл/кг) в обидві кінцівки через 7 днів після останньої ін'єкції STZ.

На 7-му добу після ін'єкції гліцеролу в групі «Діабет+рабдоміоліз» тварин усіх експериментальних груп декапітували [105].

**- *Моделювання хронічної бронхіальної астми***

В досліді використовували загальноприйнятту овальбумін(OVA)-індуковану модель бронхіальної астми (БА) у мурчаків [71, 106].

Тварин було поділено на 6 експериментальних груп:

- інтактні тварини (Контроль);
- тварини сенсibilізовані (в/ч ін'єкція 0,1% OVA) без наступних провокацій (Сенсibilізація);
- тварини провоковані (інгаляція) 0,1% OVA без сенсibilізації алергеном (Провокація);
- тварини сенсibilізовані та провоковані 0,1% OVA, (Бронхіальна астма, БА);
- тварини з БА, які отримували перорально 0,05% семікарбазид (SC), ~ 10 мг/кг/добу (БА+ SC-1)
- тварини з БА, які отримували 0,2% SC вигляді аерозолі, ~ 10 мг/кг/на інгаляцію (БА+SC-2).

Сенсibilізацію, набуття організмом гіперчутливості до певної сполуки протеїнової природи, виконували за таким протоколом. Як алерген використовували OVA. Експериментальних тварин груп «Сенсibilізація» та «БА» активно сенсibilізували двічі внутрішньочеревним введенням 100 мкг OVA та 10 мг суспензії ад'юванту Al(OH)<sub>3</sub>, диспергованих в 1 мл стерильного фізіологічного розчину, на 1 тварину на 1-й та 5-й день [71, 106].

Протокол провокацій розпочинали через 28 днів після сенсibilізації. Провокація – другий контакт сенсibilізованого організму з алергеном, що призводить до клінічних проявів захворювання — алергічного запалення. В експериментальних групах «Провокація», «БА», «БА+SC-1», «БА+SC-2» проводили провокації 0,1% аерозолем OVA в прозорій пластиковій камері

об'ємом 5 л за допомогою компресорного інгалятора/небулайзера (Amrus AMNB-500, США, швидкість витрати рідини 0,25 мл/хв) притримуючись наступного графіку: 1-й, 3-й, 5-й дні. Тривалість експозиції становила 15 хв або до появи гострих проявів гіперреактивності дихальних шляхів (тахіпное, стридору та бронхоспазму), що загрожували життю лабораторних тварин. В групі тварин «Сенсибілізація» виконували провокації фізрозчином, за аналогічним графіком [71].

SC тваринам груп «БА+SC-1» та «БА+SC-2» вводили наступним чином. Перша група отримувала 0,05% SC 5 днів на тиждень з питвом починаючи з 1-го дня провокацій. Друга група отримувала SC у вигляді інгаляцій 0,2% розчином тривалістю 5 хв 3 рази на тиждень також починаючи з 1-го дня провокацій [71].

Тварин виводили з експерименту через 18 – 20 год після останньої провокації відповідно до положень (див. п. 2.1 «Тварини»). Експериментальним мурчакам інтраперитонеально вводили тіопентал натрію (190 мг/кг маси тварин) та знеболювали ін'єкцією лідокаїну (8 мг/кг маси тварин) в шию [71].

#### **- *Модель Блеоміцин С-індукованого фіброзу легені***

Для моделювання фіброзу легені щурам вводили протипухлинний антибіотик «Блеоміцин-С» (BLM) за протоколом, описаним в [107]. 18 самців щурів лінії Wistar були розділені на 4 експериментальні групи: «Контроль» - інтактні тварини (n=4); «BLM» - тварини, яким вводили BLM одноразово інтратрахеально в дозі 5 мг/кг маси тіла (n = 4); «BLM+SC» - тварини, які отримували SC у концентрації 0,005% з питною водою (~1,0 мг/кг/добу) протягом 3-х тижнів, починаючи відразу після введення BLM (n=7); «Контроль+SC» (негативний контроль) - інтактні тварини, які отримували також 0,005% SC з питною водою одночасно з групою «BLM+SC» (n=3).

### **2.2 Моделі *in vitro***

#### **- *Дослідження біотрансформації семікарбазиду мікросомною фракцією печінки щурів***

Для ідентифікування продуктів реакції розкладання семікарбазиду

мікросомною фракцією печінки використовувалися умови, описані в [108]. Авторами показано утворення формальдегіду (FA) з карциногену *N*-нітрозодиметиламіну (NDMA) та SC фракцією S9 (постмітохондрійна) печінки щурів, що містить цитохроми P-450 (CYP450). Інші продукти розкладання SC в згаданій роботі не визначали. Тому нами було запропоновано гіпотетичний механізм, згідно якого з SC в монооксигеназній реакції за участі CYP450 в 2 етапи утворюються, крім FA, також NO та амоній [109]. В своїй роботі як джерело CYP450 ми використали мікросомну фракцію печінки щурів. Реакцію проводили в 5 мМ Трис-НСІ оксигенованому буфері (рН 7,2), що містив 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 4,5-6 мг протеїну мікросомної фракції, 7,5 мМ семікарбазид або 5 мМ NDMA як субстрат, до складу системи генерування NADPH входили 0,5 мМ NADP<sup>+</sup>, 7,5 мМ ізолимонна кислота і 1 U/мл ізоцитратдегідрогенази в кінцевому об'ємі 2,2 мл. Під час інкубування пробірки щільно закривали, щоб уникнути випаровування, забруднення повітря та поглинання з повітря реакційною сумішшю додаткової кількості FA. Реакцію проводили при струшуванні на водяній бані при 37°C впродовж 30 хв. Через певні проміжки часу (0, 15 і 30 хв) відбирали по 100 мкл реакційної суміші і додавали до 10 мкл охолодженого 30% ZnSO<sub>4</sub> для осадження протеїну, після чого центрифугували (2500×g, 10 хв). Контрольні зразки містили всі компоненти реакційної суміші за винятком субстрату. Після осадження протеїну центрифугуванням, в надосадовій рідині визначали продукти реакції: FA, NO та амоній [109].

*Вміст FA* оцінювали колориметричним методом за допомогою реакції Hantzsch на мікропланшетному рідері μQuant (Biotek, US). Для цього надосадову рідину змішували з рівним об'ємом реактиву Неша [110] та інкубували протягом 40 хв при 37°C. Контрольна проба містила розчин, оброблений аналогічно, але без субстрату та мікросомної фракції. Оптичну густину зчитували при 412 нм. Стандарти містили відомі кількості FA у

буфері. Для підтвердження присутності FA в реакційній суміші додатково використовували пастку FA, димедон [111], в концентрації 5 мМ [109].

*Вміст NO* визначали спектрофотометрично на мікропланшетному рідері  $\mu$ Quant (Biotek, US) за накопиченням нітриту в середовищі за методом Грісса. [112]. Стандарти містили відомі кількості  $\text{NaNO}_2$  у буфері. Для підтвердження присутності в реакційному середовищі NO, тобто, що визначена кількість нітриту є еквівалентною кількості утвореного оксиду азоту, додавали пастку NO, комплекс диетилдитіокарбамату та заліза (II) ( $\text{DDC-Fe}^{+2}$ ) [113]. Для цього реакцію проводили, як зазначено вище, з послідовним додаванням 5 мМ NaDDC та 5 мМ  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  в реакційне середовище [109].

*Вміст амонію* детектували флуорометричним методом на мікропланшетному рідері Flx800 (Biotek, US) за [114, 115]. До складу реакційної суміші входили: 750 мМ *o*-фталевий альдегід, 72 мМ  $\beta$ -меркаптоетанол в етанолі та 200 мМ Na,K-фосфатний буфер (1:1:18). Стандарти містили відомі кількості  $\text{NH}_4\text{Cl}$  у буфері. Вимірювання флуоресценції проводили при  $\lambda_{\text{ex}}=340$  нм та  $\lambda_{\text{em}}=450$  нм. Кількість іонів амонію визначали за калібрувальною кривою і виражали в нмолях іонів амонію на 1 мл суміші [109].

#### - *Культивування екаріотичних клітин*

Клітини карциноми легені Льюїс миші (LLC) культивували в середовищі RPMI 1640 (Gibco®), що містило 10% ембріональної телячої сироватки (FCS, NuClone), 50 од./мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2 мМ L-глутаміну, при температурі 37°C та 5%  $\text{CO}_2$  у зволоженій атмосфері. Клітини пасажували у співвідношенні 1:3-1:5 кожні 2-3 дні при досягненні 70-80% конфлюенту. В роботі використовували субпопуляції клітин лінії LLC зі стабільно зниженим рівнем експресії адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85 та відповідні контрольні клітини Scr [116].

### 2.3 Підготовка експериментальних зразків

#### - *Отримання бронхо-альвеолярного лаважу (БАЛ)*

Для отримання БАЛ експериментальним мурчакам під наркозом та знеболенням ендотрахеально вводили канюлю та тричі проводили промивання легень 0,9% NaCl (1мл/100 г маси тварини). Рідину БАЛ центрифугували 500×g протягом 15 хв при 4°C [71]. Клітини БАЛ ресуспендували в стерильному 0,9% NaCl й використовували для визначення кількості імунних клітин, що генерують NO [116]. Супернатант БАЛ, що не містив клітин, використовували для визначення активності DAO.

#### - *Підготовка зразків тваринних тканин та еукаріотичних клітин для вимірювання біохімічних показників*

У тварин збирали кров у пробірки з/без гепарину, у мурчаків з вушної вени, а у щурів методом декапітації. Розтин грудної клітки щурам робили після декапітації, а мурчакам під наркозом після забору БАЛ. У щурів на лід забирали тимус, верхню частину правої легені, печінку (1 долю), нирку. Всі наступні маніпуляції зі зразками тканин проводили при 0–4°C. У мурчаків забирали праву легеню та заморожували її в рідкому азоті, а також одночасно відбирали зразки шкіри для екстрагування колагену (див. далі).

Незаморожені легеню, печінку та нирку щурів подрібнювали ножицями та гомогенізували в 0,01 М Трис/HCl буфері рН 7,2, що містив 0,25 М сахарозу у співвідношенні 1:10 (w/v). З отриманих гомогенатів методом диференційного центрифугування отримували *субклітинні фракції, цитозольну та мікросомну* [109]. Гомогенат фільтрували через 2 шари хірургічної марлі і центрифугували при 700×g протягом 10 хв. Осад відкидали, а супернатант центрифугували при 9000×g протягом 20 хв. Отриманий супернатант центрифугували при 105000×g протягом 1 год. Супернатант, цитозольну фракцію, збирали при 0-4°C та використовували для вимірювань відповідних біохімічних показників. Осад, мікросомну фракцію, ресуспендували в тому ж самому буфері, що містив 0,25 М сахарози (1 мл буфера на 1 г вологої печінки), і залишали при 0-4 °C до

використання [109]. Отримані фракції використовували для подальшого визначення необхідних показників. В цитозольній фракції визначали ензиматичні активності CAT (каталазу та пероксидазу), SOD1, GPx, XO, DAO, PAO, в мікросомній - активність SSAO.

Для визначення активності LOX в легені тварин використовували *екстракти*, отримані за протоколом, що описаний в [118] та модифікований нами. З тканини легені, що була заморожена в рідкому азоті, готували гомогенати в 0,1 М Na-боратному буфері pH 10,5, які піддавали озвучуванню безконтактним способом на ультразвуковому дезінтеграторі (УЗДН -1 У4.2, СРСР) при 22 кГц, 0-4 С, 30 с з наступним центрифугуванням при 12000×g, 10 хв, супернатанти збирали в чисті пробірки [119].

Для визначення вмісту IL-13 та iNOS в легені, частину замороженої тканини гомогенізували в рідкому азоті, екстрагували PBS та центрифугували при 5000×g, 5 хв.

Гепаринізовану кров методом центрифугування (2500×g, 10 хв) розділяли на *плазму та еритроцитарну масу*. Після відбирання плазми та білого шару тромбоцитів, еритроцити двічі промивали PBS та гемолізували 5-кратним об'ємом бідистильованої води. Гемолізати еритроцитів піддавали очищенню етанол-хлороформним методом з метою позбавлення від гемоглобіну [120]. Для цього до 1 мл гемолізату додавали по черзі 0,3 мл етанолу, 0,15 мл хлороформу та 300 мг  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (з перемішуванням протягом 5 хв на холоді на кожному етапі). Суміш центрифугували при 15000×g 30 хв (0-4°C). Плазму та додатково очищені гемолізати еритроцитів використовували для подальших досліджень. В плазмі крові визначали вміст IL-4, а також активності XO, DAO та SSAO, в очищених гемолізатах - активності SOD1 та CAT.

З евкаріотичних клітин в культурі, що досягли 70-80% конфлюенту, отримували *цитоплазматичні екстракти* за допомогою гіпотонічного буферу, що містив 0,4% NP-40, 10 мМ HEPES (pH 7,9) 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 10 мМ KCl, 1 мМ  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 мМ бензамідин, 1 мМ PMSF, 10 мкг/мл апротиніну, 10

мкг/мл лейпептину та 1 мкг/мл пепстатину протягом 15 хв на льоду. Співвідношення між площею клітинної культури і об'ємом буферу для екстрагування такі ж, як і для отримання клітинних лізатів. Клітини зшкрябували, акуратно піпетували і переносили в пробірки об'ємом 1,5 мл. Зразки двічі заморожували/розморожували у рідкому азоті, піпетували, обробляли ультразвуком протягом 30 с та центрифугували при  $2500\times g$  протягом 15 хв при  $4^{\circ}C$ . Супернатанти переносили у чисті пробірки та знову центрифугували при  $12000\times g$  30 хв при  $4^{\circ}C$  [121]. В отриманих супернатантах (цитоплазматичні екстракти) визначали концентрацію протеїну, активності ензимів SSAO, DAO, PAO, LDH, ALDH, SOD, CAT, GPx, та концентрацію  $H_2O_2$ . В кондиційованому середовищі вирощування клітин визначали активність LOX та вміст лактату.

З видаленого та перенесеного у PBS тимусу отримували *тимоцити* шляхом розриву тканини з вивільненням клітин у PBS, з наступним фільтруванням суспензії через тричі згорнуту марлю та центрифугуванням ( $200\times g$  протягом 5 хв) при кімнатній температурі. Клітини двічі промивали і ресуспендували в середовищі RPMI-1640, що містить 10 мМ буфер HEPES-NaOH (pH 7,3), 0,1% BSA, 100 U/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину і 50 мкМ 2-меркаптоетанолу. Життєздатність клітин оцінювали за поглинанням барвника трипановий синій (0,4%) з використанням гемоцитометра Нейбауера [122]. Клітини лізували 10 мМ трис/HCl буфером pH 7,6, що містив 5 мМ  $MgCl_2$  та 0,1 мМ PMSF. Залишки клітин видаляли центрифугуванням при  $6000\times g$  протягом 5 хв, і супернатанти використовували для подальшої оцінки ензиматичних активностей PAO, DAO, SOD, CAT. Для визначення активності SSAO використовували суспензії клітин в PBS.

- *Підготовка зразків для гістологічних, морфологічних та морфометричних досліджень*

За моделювання БА ліву легеню видаляли та фіксували у 10% нейтральному забуференому формаліні. Для гістологічних досліджень зразки



легені заливали парафіном та робили зрізи товщиною 5 мкм, що надалі фарбували гематоксиліном та еозином [71].

За моделювання *BLM*-індукованого фіброзу відбирали зразки тканини лівої легені розміром 0,5x0,5 см. Зразки тканини фіксували в рідині Буена, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації (від 70° до 96°) і диоксані, заливали парафіном і робили зрізи товщиною 4 мкм для фарбування гематоксиліном та еозином. Пофарбовані зрізи заливали канадським бальзамом [107] для проведення необхідних досліджень.

#### - Підготовка зразків для ЕПР аналізу

Плазму крові та фрагменти печінки заморожували в прес-формах у рідкому азоті та зберігали за цих умов до проведення ЕПР-спектроскопічного аналізу.

## 2.4 Методи визначення ензиматичних активностей

#### - Амінооксидази

Для оцінки активності АОаз був розроблений флуорометричний метод, заснований на визначенні кількості продукту реакції пероксиду водню за інтенсивністю флуорофору, на який перетворюється  $H_2O_2$  за присутності фолієвої кислоти [104].

Оскільки АОази, *SSAO*, *PAO*, *DAO*, локалізовані в різних компартментах клітини, для визначення їх активностей, ми використовували відповідні клітинні фракції (див. п. 2.3), які попередньо інкубували зі специфічними інгібіторами (за кімнатної температури, 20 хв) для пригнічення активності інших АОаз, що присутні в цих зразках та конкурують за субстрат з амінооксидазою, активність якої визначається. У випадку *SSAO* застосовували 0,1 мМ паргілін для гальмування активності *MAO*. Для визначення активності *PAO* - 0,43 мМ *SC* або 0,05 мМ *DDC* для інгібування *DAO*, при визначенні активності *DAO* – 0,015 мМ дифеніленйодоній для інактивування *PAO*. Склад реакційного середовища був наступним: клітинна фракція (0,5-0,75 мг протеїну), субстрат (0,1 мМ

метиламін для SSAO, 0,1 мМ гістамін/путресцин – для DAO, 0,1 мМ спермін – для PAO), 1 мМ  $\text{NaN}_3$  (для інактивування гем-вмісних ензимів, які розкладають продукт реакції  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) і 1,7 мМ К-фосфатний буфер, рН 7,2, в кінцевому об'ємі 250 мкл [104].

Для визначення активності **LOX** реакційне середовище містило аліквоту тканинного екстракту (0,015-0,5 мг протеїну), субстрат (13 мМ 1,5-діамінопентан), 1 мМ  $\text{NaN}_3$  і 50 мМ натрій боратний буфер рН 8,2 з 1,2 М сечовиною в кінцевому об'ємі 260 мкл. Як контроль використовували проби того ж складу, але зразок, що містив ензим, попередньо інкубували з інгібітором LOX,  $\beta$ -амінопропіонітрилом (0,2 мМ) протягом 30 хв [119].

Інкубування реакційних сумішей проводили протягом 30 хв при 25°C (для SSAO і DAO) або 37°C (для PAO та LOX) при струшуванні. Реакцію припиняли додаванням 30%  $\text{ZnSO}_4$  або 0,6 М  $\text{HClO}_4$  (для депротейнування). Після центрифугування при 2500 $\times$ g протягом 10 хв супернатанти використовували для детектування  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для цього аліквоти супернатантів вносили в комірки 96-лункових чорних планшетів, після чого додавали 0,01 мМ фолієву кислоту та 0,02 мМ  $\text{CuCl}_2$ . Після інкубування в темряві при 37°C протягом 60 хв вимірювали флуоресценцію за  $\lambda_{\text{ex}}=360$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=460$  нм на мікропланшетному рідері (FLx800, Biotek, США). Концентрацію  $\text{H}_2\text{O}_2$  визначали за калібрувальною кривою в межах 10-500 мкМ. Питому активність ензиму виражали як мкмоль продукту, що утворюється за 1 хв за присутності 1 мг протеїну [104].

#### - **Каталаза**

Детектування **каталазної активності** ензиму в тканинних зразках проводили згідно [123]. Для цього використовували 0,015 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $E_{240}=0,645$ ) розведений у 0,01 М фосфатному буфері (рН 7,5). До 3 мл розчину  $\text{H}_2\text{O}_2$  додавали 5 мкл розчину протеїну. Вимірювання проводили на спектрофотометрі UNICO UV-2100 (США) відносно контрольної проби, що містила 5 мкл протеїну у фосфатному буфері без  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Фіксували час, за який екстинкція субстрату добігає  $\frac{1}{2}$  початкового значення, при цьому цей

час не мав перевищувати 100 с. Для кожного окремого випадку (вид тварини, органу/тканини, сезон) кількість протеїну підбиралась окремо, для отримання необхідної різниці між вихідним та кінцевим значенням екстинкції за встановлені часові межі. Активність каталази *в цитоплазматичних екстрактах клітин* визначали розробленим флуорометричним методом [121], заснованим на вимірюванні залишкової кількості  $\text{H}_2\text{O}_2$  після дії каталази протягом 3 хв. Реакційна суміш містила 150 мкл 10 мМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  у 10 мМ Na-K фосфатному буфері, рН 7,5 та 5-20 мкл клітинного екстракту з концентрацією протеїну 1-2 мг/мл. Реакцію припиняли додаванням холодного 30% розчину  $\text{ZnSO}_4$  з наступним центрифугуванням при  $2500\times g$  протягом 10 хв [121]. Виявлення  $\text{H}_2\text{O}_2$  проводили як описано у п. «Активність амінооксидаз» [104]. Питому активність каталази виражали в мкмоль  $\text{H}_2\text{O}_2$ , що розкладався за 1 хв на мг протеїну.

*Пероксидазну активність каталази* визначали з метанолом як донором протонів з використанням барвника пурпалду при  $25^\circ\text{C}$  методом, що був розроблений Johansson et al. [124] та модифікований нами для 96-лункових планшетів [104]. У цій реакції формальдегід, що утворюється з метанолу, вступає в реакцію з пурпалдом з утворенням хромофору, пік оптичної густини якого детектується при 540 нм. Кількість утвореного формальдегіду визначали за стандартною кривою при кожному визначенні [104]. Одна одиниця питомої активності ензиму в пероксидазній реакції дорівнювала 1,0 мкмоль формальдегіду, утвореному за 1 хв на 1 мг протеїну.

#### - *Супероксиддисмутаза*

*В тканинних зразках* активність ензиму детектували згідно протоколу, описаному в [125] за інгібуванням хемілюмінесценції люмінолу, індукованої супероксид аніонами, які продукуються в системі ксантин/ксантинооксидаза. В комірки білих непрозорих 96-лункових планшетів вносили 10 мкл відповідного зразка, який містив ензим, або  $\text{H}_2\text{O}$  (контроль), 165 мкл 500 мМ бікарбонатного буферу з ЕДТА (рН 10,1), 20 мкл 2,5 мМ ксантину, 20 мкл 0,01 М люмінолу. Реакцію ініціювали додаванням 20 мкл ксантинооксидази

(0,08 мг/мл) і проводили її при кімнатній температурі. Інтенсивність хемілюмінесценції зчитували при  $\lambda_{em}=460$  нм на мікропланшетному рідері (FLx800, Biotek, США) кожні 30 с протягом 3 хв в режимі «Кінетика». 1 одиниця питомої активності ензиму відповідала кількості протеїну, яка викликала 50% інгібування швидкості утворення супероксиданіону в контрольному зразку без протеїну.

Визначення активності SOD *в цитоплазматичних екстрактах клітин* проводили за допомогою набору «SOD Assay Kit-WST» (Sigma-Aldrich) відповідно до протоколу виробника. Метод ґрунтується на тому ж принципі, що й у вищевикладеному методі [125]. Генерування супероксиду детектували за утворенням хромофору – похідного нітросинього тетразолію при 450 нм. Одиниця активності ензиму відповідала кількості протеїну, яка викликала 50% інгібування утворення супероксиду порівняно з контрольними пробами, що не містили цитоплазматичного екстракту.

#### - *Ксантиноксидаза*

Метод заснований на визначенні швидкості утворення сечової кислоти при довжині хвилі 295 нм з ксантину за присутності ХО. Реакційна суміш містила PBS з 0,3 мМ EDTA та 0,25 мМ ксантину, зразок (плазми крові або цитозольну фракцію тканинного гомогенату), що містили ензим. Питому активність ензиму виражали в мкмолях сечової кислоти, що утворилась за хв за присутності відповідної кількості протеїну [126].

#### - *Глутатіонпероксидаза*

Активність ензиму визначали за швидкістю окислення відновленого глутатіона (GSH) за присутності пероксиду водню. Кількість GSH після зупинки реакції визначали спектрофотометрично (при 412 нм), використовуючи кольорову реакцію взаємодії SH-груп з 5,5'-дітіобіс (2-нітробензійною) кислотою з утворенням забарвленого продукту – тіонітрофенільного аніону. В контрольну пробу (для визначення неензиматичного окислення GSH за присутності  $H_2O_2$ ) замість зразка

вносили такий самий об'єм дистильованої води. Реакцію проводили за присутності інгібітора каталази –  $\text{NaN}_3$ . Питому активність ензиму виражали в мкмольх GSH, що був витрачений за 1 хв на мг протеїну в зразку [127, 128].

- ***Альдегіддегідрогеназа***

Активність ензиму визначали за кількістю утвореного NADH флуоресцентним методом. Для посилення та зсуву флуоресценції NADH до 600 нм, де біологічні зразки не флуоресціюють, в реакційну суміш додавали резазурин та феназинметасульфат. Інтенсивність флуоресценції вимірювали при довжинах хвиль збудження  $\lambda_{\text{ex}}=528/545$  нм й емісії  $\lambda_{\text{em}}=600$  нм. Кількість утвореного NADH визначали за калібрувальною кривою. Реакційна суміш містила: 100 мМ пірофосфат Na, рН 9,0, 10 мМ гліоксаль, 0,5 мМ NAD, 1 мМ ЕДТА, 0,1 мМ резазурин, 0,1 мМ феназинметасульфат в кінцевому об'ємі 0,2 мл. Реакцію запускали додаванням 0,020 мл цитозольної фракції тканинного гомогенату або цитоплазматичного екстракту з концентрацією загального протеїну  $\sim 2$  мг/мл [129].

- ***Лактатдегідрогеназа***

Активність ензиму детектували колориметричним методом за допомогою набору (Lactate dehydrogenase activity assay kit, Sigma-Aldrich) згідно протоколу виробника. LDH відновлює  $\text{NAD}^+$  до NADH, який специфічно детектується при  $\lambda=450$  нм. Одиниця активності відповідає кількості ензиму, за присутності якої продукується 1,0 мкмоль NADH за 1 хв при 25°C.

## **2.5. Визначення вмісту метаболітів**

- ***Лактат***

Лактат вимірювали в супернатантах кондиційованого середовища вирощування клітин після центрифугування при  $8000\times g$  протягом 10 хв за допомогою спектрофотометричного методу, який ґрунтується на оберненій реакції LDH, відновлення  $\text{NAD}^+$  при перетворенні лактату у піруват [130]. Вимірювання здійснювали на рідері  $\mu\text{Quant}$  (США) при 340 нм в буфері, що

містив 280 мМ гідразин, 467 мМ гліцин, 2,6 мМ EDTA, до якого додавали аліквоту стандартного розчину лактату або кондиційованого середовища та 2,5 мМ  $\beta$ -NAD. Контрольна проба містила всі компоненти крім розчину з лактатом. Реєстрували вихідне значення екстинкції в контрольних і дослідних комірках планшету, і запускали реакцію додаванням 10 мкл розведеного у 5 разів комерційного препарату ензиму (L-Lactic Dehydrogenase from rabbit muscle, Sigma). Зростання абсорбції зчитували в кінетичному режимі кожні 60 с при 340 нм до моменту закінчення реакції. Концентрацію лактату в середовищі розраховували за значенням кінцевої екстинкції та коефіцієнту пропорційності, який отримували з використанням стандартних розчинів даної речовини, та виражали в кількості ммоль на 1 мл кондиційованого середовища.

- *Пероксид водню*

Вміст  $H_2O_2$  визначали в депротейнізованих зразках цитоплазматичних екстрактів клітин. Для цього до зразків додавали охолоджений 30%  $ZnSO_4$  в кількості 10% від загального об'єму з наступним центрифугуванням при  $2500 \times g$  протягом 10 хв. Для подальших визначень використовували супернатант. Детектування  $H_2O_2$  проводили аналогічно, як і при визначенні активності амінооксидаз [104].

## **2.6 Імуноензимний аналіз (ELISA)**

- *Визначення вмісту 3-нітротирозину*

Вимірювання показника в протеїнах плазми крові щурів з діабетом та діабетом, ускладненим рабдоміолізом здійснювали за допомогою набору подвійного сандвіч-ІФА (Abbkine, Китай) згідно з протоколом виробника. Зразки, стандарти та контролю вносили у комірки мікропланшету, попередньо вкриті антитілом, специфічним до 3-NT. Наявний в пробах 3-NT зв'язувався іммобілізованим антитілом. Після цього в комірки додавали антитіла до 3-NT, кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP-Conjugate Rat 3-NT). Після кожного етапу інкубації комірки мікропланшету тричі промивали PBS. Після останньої відмивки до комірок додавали розчин хромогену, забарвлення

якого розвивалося пропорційно кількості 3-NT, зв'язаного на початковому етапі. Розвиток забарвлення припиняли додаванням 0,25 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> і колориметрично вимірювали його інтенсивність [105].

- ***Визначення вмісту індукцйбельної NO-синтази***

*i*NO-синтазу детектували в тканинах легені мурчаків всіх експериментальних груп за моделювання атопічної бронхіальної астми з використанням комерційного ELISA набору (Guinea pig nitric oxide synthase 2 (inducible) CUSABIO BIOTECH CO, LTD, China) згідно протоколу виробника [71].

- ***Визначення рівнів інтелейкіну-4 та інтерлейкіну-13***

Інтелейкін-4 та інтерлейкін-13 оцінювали в плазмі крові та зразках легені мурчаків всіх експериментальних груп за моделювання атопічної бронхіальної астми, відповідно, з використанням комерційних ELISA наборів (Guinea pig interleukin 4 and 13, CUSABIO BIOTECH CO, LTD, China) згідно протоколу виробника [71].

**2.7. Визначення рівня продукування NO в імунних клітинах, інфільтрованих в дихальні шляхи мурчаків всіх експериментальних груп за моделювання атопічної бронхіальної астми визначали в суспензії клітин БАЛ методом протокової цитометрії на протоковому цитометрі Beckman Coulter (США) з використанням зонду DAF-2DA (Sigma-Aldrich, Germany). Кінцева концентрація флуоресцентного зонду в зразку становила 10 мкМ. Для забарвлення використовували суспензію клітин БАЛ концентрацією 5x10<sup>6</sup> клітин/мл в стерильному фізрозчині. Зразки інкубували 30 хв при 37°C в темряві. Відсоток клітин в суспензії, які продукують NO, визначали за інтенсивністю флуоресценції по FL-1 каналу (525±10 нм), по 10000 подій для кожного виміру [71].**

**2.8. Спектроскопічні дослідження**

- ***Отримання спектрів електронного парамагнітного резонансу***

Спектр ЕПР реєстрували в підготовлених зразках крові та печінки експериментальних тварин на радіоспектрометрі Varian E-109 (США) при температурі рідкого азоту.

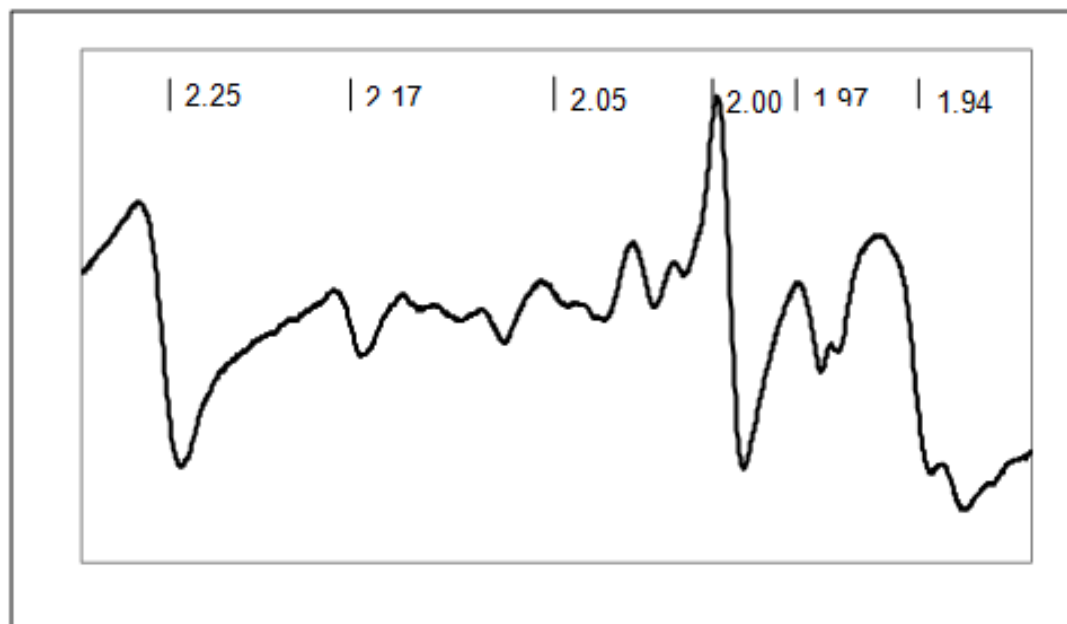
Параметри запису спектрів зразків тканини печінки наступні:

- 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 спектру 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 (Рис. 2.1) визначали розмах сигналів:



**Рис. 2.1.** ЕПР спектр печінки щурів

$g=2,25$  - СУР450 з гемовим Fe в низькоспіновій окисленій формі;



$g=2,14$  - протеїни ендоплазматичного ретикулума, що містять  $Mn^{2+}$ ;  
 $g=2,05$  – протеїни, що містять  $Cu^{2+}$ : SOD, 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, ксантиоксидаза;

$g=1,94$  – Fe-S протеїни мітохондрійних дихальних ланцюгів з негемовим Fe у відновленому стані;

В спектрі ЕПР крові визначали:

$g=6,0$  - метгемоглобін з гемовим Fe 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  $10^{-7}$  сек.

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

Інтенсивність сигналів визначали як відстань (різниця у значеннях вихідного сигналу з детектора радіоспектрометра) між максимальним та мінімальним значенням першої похідної поглинання НВЧ енергії у відповідному діапазоні  $g$ -фактора (при постійній частоті НВЧ генератора, в діапазоні змін напруження магнітного поля).

#### ***- Отримання диференційних спектрів***

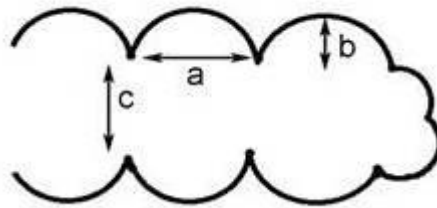
Абсорбційні спектри мікросомної фракції печінки щурів в 10 мМ Трис-НСІ буфері (рН 7,2) з концентрацією протеїну 0,4-0,9 мг/мл в 1 см кюветі зчитувалися за відсутності та в присутності SC в широких межах концентрації від 0,05 мМ до 10 мМ на спектрофотометрі  $\mu$ Quant (BioTek, США). Розчини SC у цьому ж буфері додавали до 1 мл суспензії мікросом до кінцевого об'єму не більше 1% від загального об'єму розчину. Діапазон довжин хвиль зазвичай охоплював від 350 до 500 нм, а показники, усереднені за 3-5 сканувань, брали з кроком 1 нм. Диференційні спектри розраховували

відніманням вихідного спектру ( $t=0$  с) зі спектрів, отриманих через певні часові проміжки 5-30 хв інкубування [109].

## 2.9 Гістологічні та морфометричні дослідження

Гістологічні та морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Nikon (Японія), оснащеному точковою цифровою камерою. Морфометрію проводили за допомогою комп'ютерної програми «IMAGE J» 1.45S (National Institutes of Health, США).

У легені мурчаків за моделювання БА визначали: ширину входу в альвеолу (a); альвеолярну глибину (b); ширину альвеолярного ходу (c) (Рис. 2.2). Для оцінки зміни конфігурації респіраторних бронхіол розраховували такі показники: відношення ширини входу в альвеолу до її глибини ( $a/b$ ; Coef.1) та відношення ширини альвеолярного ходу до подвійної глибини альвеоли ( $c/2b$ ; Coef.2) [71].



**Рис. 2.2.** Схематичне зображення респіраторних бронхіол легені в нормі: a - ширина входу, в альвеолу; b – глибина альвеоли; c – ширина альвеолярного ходу [71].

В легені щурів за моделювання фіброзу легені вимірювали середній діаметр просвіту, глибину та площу поперечного перерізу альвеол, визначали ширину входу в альвеолу, вимірювали товщину перетинки, діаметр респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів та альвеолярних мішечків. Визначали співвідношення ширини входу в альвеолу до її глибини та співвідношення діаметру респіраторних бронхіол, альвеолярних ходів і мішечків до подвійної глибини альвеоли [107]. Всі морфометричні виміри респіраторного відділу легені проводили при збільшенні мікроскопа в 200 разів.

## 2.10. Електрофорез протеїнів в ПААГ Вестерн-блот аналіз

Для приготування 10% гелю для розділення та 4,5% гелю для концентрування протеїнів використовували наступні реактиви:

Розчин мономерів «АА»: 30% акриламід/0,8% метиленбісакриламід;

Буфер А для розділяючого гелю: 3М Трис-НСІ, рН 8.8;

Буфер Б для концентруючого гелю: 0,5М Трис-НСІ, рН 6.8;

10% розчин додецилсульфату натрію (ДСН);

10% розчин персульфату амонію (АПС);

Електродний буфер: 25 мМ Трис-НСІ, рН 8.3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН;

Компоненти, необхідні для приготування гелю, змішували у кількостях, наведених у Таблиці 2.1.

Лізати клітин вносили за допомогою мікрошприца на дно комірок концентруючого гелю з розрахунку 10 мкг протеїну на один трек. Протеїни розділяли електрофорезом при 15-25 мА (70-110 В), після чого переносили на нітроцелюлозну мембрану у буфері для переносу (25 мМ Трис-НСІ, рН 8.3, 192 мМ гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол) протягом 90 хв при силі струму 250 мА.

**Таблиця 2.1.** Склад гелів для розділення та концентрування протеїнів в ПААГ

Т, %	Буфер А, мл	Буфер Б, мл	АА 30%, мл	H <sub>2</sub> O, мл	ДСН 10%, мл	ТЕМЕД, мкл	АПС 10%, мл	Об'єм гелю, мл
10	0,75	-	2	3,18	0,06	6	0,06	6
4,5	-	0,5	0,3	1,162	0,02	2	0,02	2

Для блокування вільних центрів зв'язування мембрану інкубували у блокувальному розчині (3% BSA, 1% Tween-20 у PBS протягом 1 год при кімнатній температурі. Після цього мембрану інкубували з поліклональними кролячими антитілами проти LOX (Anti-LOX recombinant rabbit primary antibody, Abcam, US (ab174316)) у розведенні 1 : 1000 та моноклональними щурячими антитілами проти  $\alpha$ -тубуліну у розведенні 1 : 500 протягом 12-16 год при 4°C. Відповідні другі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому (Cell Signaling),

використовували в розведенні 1:2000. Мембрану інкубували протягом 45 хв при кімнатній температурі, після чого імунореактивні смуги виявляли за допомогою комерційного набору для підсиленої хемілюмінесценції ECL (Enhanced chemiluminescence kit) (Amersham Pharmacia Biotech). Час експозиції мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 30 с - 5 хв. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику і фіксували кислим фіксажем. Денситометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення Gel-Pro analyzer (Media Cybernetics, <http://gel-pro-analyzer.software.informer.com/3.1/>).

### **2.11. Екстрагування колагену з бронхів та шкіри**

Для екстрагування колагену видалені бронхи щурів та очищену від шерсті шкіру мурчаків з БА розрізали на невеликі шматочки, попередньо обробляли 0,3 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1:5 (мас/об)) перемішуванням на магнітній мішалці протягом 10 год для видалення неколагенових протеїнів, з подальшим центрифугуванням при  $900\times g$  протягом 15 хв при кімнатній температурі. Супернатант відкидали. Процедуру повторювали тричі. Зразки промивали холодною дистильованою водою при перемішуванні при  $4^\circ\text{C}$  протягом 2 год, досягаючи нейтрального значення рН промивної води. Осад, відмитий від протеїнів неколагенової природи, заливали 0,1 М натрій-цитратним буфером рН 3,6, що містив 3200 пепсинових од/мг (4 мг/мл буфера). Екстрагування проводили протягом 3 днів з наступним центрифугуванням при  $3200\times g$  протягом 10 хв при  $4^\circ\text{C}$ . Осад відкидали, тоді як супернатант, що містив колаген, діалізували проти 0,01 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  протягом 1-3 днів до появи осаду кристалів колагену [71]. Кількісне визначення загального колагену, а також його розчинної та нерозчинної форм проводили за вмістом гідроксипроліну за Зайдесом [131].

### **2.12. Визначення концентрації протеїну**

Концентрацію протеїну в *тканинних зразках* визначали за методом Бредфорд [132], тоді як в *цитоплазматичних екстрактах та кондиційованому середовищі вирощування клітин* за допомогою

стандартного набору Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo SCIENTIFIC). Як стандарт використовували бичачий сироватковий альбумін. Вимірювання оптичної густини проводили з модифікаціями[133].

Суть модифікації полягає в тому, що оптична густина зразків зчитується на трьох довжинах хвиль, замість однієї (максимальної в спектрі поглинання), як це зазвичай прийнято при визначенні певного показника колориметричним методом. В такий спосіб здійснюється відокремлення інтенсивності поглинання протеїну від «фонового», яке, як було показано раніше, може коливатись у діапазоні від 0,01 до 0,03 за рахунок впливу на цей показник інших компонентів реакційної суміші. Подібне фонове поглинання здатне впливати і на кінцевий результат. Дві додаткові точки поглинання встановлюються як лінії апроксимації фонового спектра і відповідають довжинам хвиль з мінімальною абсорбцією спектра, які є найближчими до максимальної (основної точки) в смузі поглинання досліджуваного зразку. Такими сполуками, що впливають на зчитування можуть виступати компоненти буферу для гомогенізації тканин та лізису клітин, а також кондиційованого середовища їх вирощування.

Істинне значення максимуму поглинання можна отримати скориставшись формулою згідно [133]:

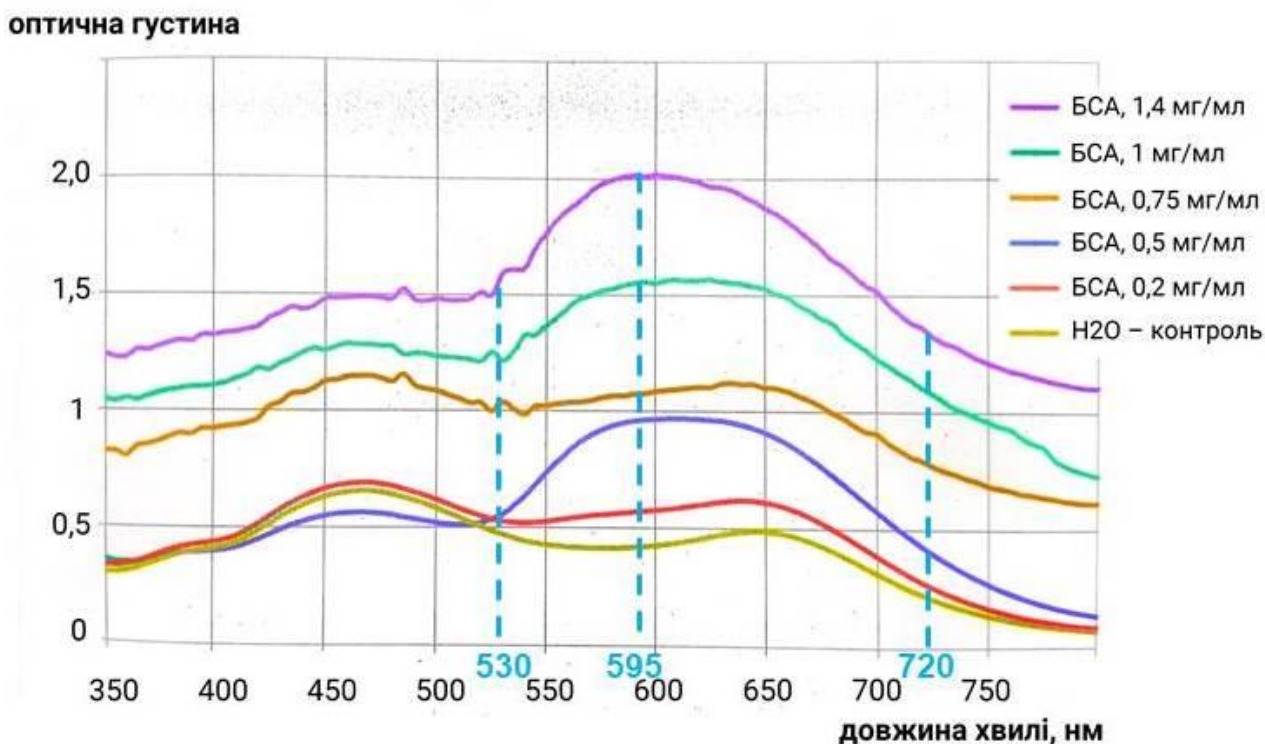
$$\Delta D = (D_2 - D_3) - \frac{(D_1 - D_3)(\lambda_3 - \lambda_2)}{(\lambda_3 - \lambda_1)}$$

де  $D_1, D_2, D_3$  – абсорбція при  $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ .

Визначення таких точок (довжин хвиль) наведено для метода Бредфорд. Для цього зчитували спектри поглинання стандартних розчинів БСА (0,2-1,4 мг/мл), забарвлених реактивом Бредфорд (рис. 2.3).

З рис .2.3 видно, що  $\lambda_1 = 530$  нм,  $\lambda_2 = 595$  нм,  $\lambda_3 = 720$  нм. Тобто, для визначення концентрації протеїну даним методом необхідно зчитувати оптичну густина зразків саме на цих довжинах хвиль. Аналогічно визначали довжини хвиль зчитування для зразків, в яких визначали концентрацію

протеїну стандартним набором Pierce BCA Protein Assay Kit:  $\lambda_1$  – 450 нм,  $\lambda_2$  – 562 нм,  $\lambda_3$  – 600 нм.



**Рис. 2.3.** Спектри поглинання БСА в межах концентрації 0,2-1,4 мг/мл, забарвлені реактивом Бредфорд

### 2.13. Статистична обробка результатів

Аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програм Excel 2007 та Statistica 4.5. Відповідність експериментальних даних нормальному розподілу перевіряли за критерієм Шапіро-Вілка з рівнем значущості 0,05. Для оцінки значущості змін використовували параметричний  $t$ -критерій. Експериментальні результати представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартного відхилення вибірки. Розраховували коефіцієнт лінійної кореляції Пірсона.

Статистичну обробку морфометричних даних проводили за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 13 TIBCO Software Inc. (SN AXA905I924220FAACD-N). Результати представлені мінімальними та максимальними значеннями показників (min-max), медіаною (M) та міжквартильним інтервалом (25%-75%). Статистичні гіпотези перевіряли за допомогою критерію Манна-Уїтні (U-тест) при  $\alpha=0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Аміноксидази - важливі чинники патологічних процесів за умов гліцерол-індукованого рабдоміолізу у щурів**

Відомо, що біогенні аміни та поліаміни залучені до регулювання основних функцій нефрону [134]. З іншого боку, продукти їх катаболічного перетворення, АФК та РКС, виявляють токсичний вплив на ниркову тканину за умов надмірного генерування [57-60]. Тому ми припустили, що АОази можуть бути патогенетичними чинниками деструктивних змін у нирці як органі-мішені низки патологічних станів, зокрема рабдоміолізу (гострої ниркової недостатності).

До патогенезу рабдоміолізу, як системного захворювання, залучена також імунна система, оскільки розрив міоцитів призводить до запалення м'язової тканини. Водночас, за цих умов індукується потужний оксидативний стрес (див. п. 1.3, *«Причетність чинників оксидативно/карбонільного стресу до розвитку гострої ниркової недостатності за рабдоміолізу»*), що, як наслідок, може викликати таку стрес-реакцію організму як акцидентальна (випадкова, не зв'язана з природними віковими змінами) інволюція тимусу [135]. З іншого боку, встановлено, що як самі поліаміни, так і продукти їх метаболізму відіграють важливу роль у контролі проліферування та диференціювання Т-лімфоцитів [136], а також виявляють дозозалежний та різноскерований вплив на життєздатність тимоцитів [137]. Беручи до уваги ці факти можна припустити, що тимус також є органом-мішенню обраної для дослідження патології, а АОази є потенційними регуляторами процесів, що призводять до негативних для цього органу наслідків.

З'ясування ролі АОаз у розвитку гострої ниркової недостатності та можливих деструктивних змін в тимусі за рабдоміолізу стало завданням

першого етапу дисертаційного дослідження. В зв'язку з цим необхідно було оцінити динаміку змін рівнів активностей АОаз (SSAO, DAO, PAO) та антиоксидантних ензимів, (CAT та SOD), в нирці та тимоцитах щурів за гліцерол-індукованого рабдоміолізу.

***- Оцінка рівнів активностей амінооксидаз та антиоксидантних ензимів в нирці щурів за гліцерол-стимульованого рабдоміолізу***

Попередніми дослідженнями на 1-й день після індукування рабдоміолізу, у щурів виявлено множинні метаболічні зміни, пов'язані з пошкодженням м'язів: 10-кратне підвищення загального рівня гему та креатинкінази в плазмі [54]. На 3-ю добу після введення гліцеролу зафіксовано збільшення в плазмі крові вмісту в 2-3 рази відносно контролю кінцевих продуктів катаболізму протеїнів, так званих азотистих відходів, сечової кислоти, сечовини та креатиніну, що свідчить про початкову фазу ураження нирки. Водночас, результати ЕПР-спектроскопії зразків крові експериментальних тварин виявили резонансний сигнал при  $g=4,3$ , що відповідало наявності пулу лабільного заліза ( $Fe^{3+}$ ), яке повністю відсутнє в крові контрольних тварин [54]. Цей пул зберігався на тому ж рівні до кінця експерименту і був основним чинником прогресування оксидативного стресу у щурів за рахунок ініціювання реакції Фентона. На 6-й день після ін'єкції гліцеролу у тварин розвивалась ГНН, про що свідчило 10-кратне збільшення вмісту сечової кислоти, сечовини та креатиніну [54].

Отримані нами результати дослідження динаміки змін рівнів активностей АОаз (SSAO, PAO, DAO) та антиоксидантних ензимів (CAT і SOD) в нирковій тканині тварин за умов прогресування патології наведені в таблицях 3.1 і 3.2.

Продемонстровано, що вже на 3-й день після індукування рабдоміолізу, коли спостерігалась поява перших ознак ураження нирки, активності SSAO та DAO досягали майже 1,5-2-кратного підвищення відносно контролю. На 6-й день, саме тоді, коли розвивалась ГНН, зафіксовано подальше зростання активності SSAO та PAO у 3 та 1,5 рази, відповідно (Табл. 3.1).



**Таблиця 3.1.** Активність амінооксидаз у нирці щурів за прогресування рабдоміолізу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ) [104].

Показники	Експериментальні групи			
	Контроль	Рабдоміоліз-1	Рабдоміоліз-3	Рабдоміоліз-6
SSAO, мкмоль $H_2O_2$ /хв/м г протеїну	0,24±0,04	0,12±0,04*	0,33±0,05	0,78±0,23*
РАО, мкмоль $H_2O_2$ /хв/м г протеїну	0,52±0,1	0,31±0,07	0,23±0,04*	0,85±0,22
DAO, мкмоль $H_2O_2$ /хв/м г протеїну	0,3±0,06	–	0,64±0,09*	–

\*  $P < 0,05$  (відносно Контролю)

Таким чином, прогресування патології, з початкової фази ураження нирки до виникнення ГНН, супроводжувалось постійним та різким на стадії загострення хвороби нирки активуванням SSAO. Скоріш за все, це відбувалось, через підвищення концентрації креатиніну, попередника метиламіну та поліамінів, у пошкодженій тканині [54, 138]. Метиламін є фізіологічним субстратом SSAO, а продукт реакції, формальдегід, що генерується за патології в надлишкових кількостях, взаємодіє з протеїнами ендотелію ниркових судин та стає причиною їх атеросклерозу [59]. Крім того, SSAO як адгезивний протеїн судин сприяє інфільтруванню лейкоцитів/лімфоцитів у осередки запалення тканини та її подальшій деструкції [139]. Особливої уваги заслуговує зростання більше ніж у 2 рази активності DAO на 3-й день прогресування патології, на стадії, коли індукується ураження нирки. Нагадаємо, що DAO – єдиний ензим, що контролює в організмі рівні прозапального аміну, гістаміну, а одним з місць локалізації його катаболічного перетворення є ниркові клубочки. Цей факт означає, що в органі-мішені мали місце підвищені рівні гістаміну та, відповідно, продуктів його окисного дезамінування. На 6-й день прогресування рабдоміолізу було виявлено зростання активності РАО у 1,5 рази порівняно з контролем, що може свідчити про відповідне зростання

рівнів вищих поліамінів, спермідину та сперміну, оскільки за патології функціонує індукбельна форма цього ензиму, яка має високу спорідненість до неацетильованого сперміну.

Продукт цієї реакції, 3-амінопропаналь, неензиматичним шляхом перетворюється на акролеїн, відомий своєю дозозалежною нефротоксичністю. Таким чином, на нашу думку, підвищення активностей всіх досліджених на цьому етапі роботи АОаз, SSAO, PAO, DAO, в нирці за прогресування рабдоміолізу можна вважати однією з важливих причин ГНН.

З іншого боку, продукування  $H_2O_2$  в реакціях окисного дезамінування амінів та поліамінів за участі АОаз дає підставу вважати цю ланку метаболізму прооксидантною. За патологічних станів організму ці метаболічні шляхи можуть бути додатковим джерелом оксидативного стресу, тоді як про ступінь його розвитку опосередковано можуть свідчити рівні активностей антиоксидантних ензимів. Результати оцінювання рівнів активностей ензимів, які залучені до продукування/перетворення  $H_2O_2$  в цитозолі клітин ниркової тканини, SOD1 та CAT, представлені у табл. 3.2.

**Таблиця 3.2.** Активність антиоксидантних ензимів у нирці щурів за прогресування рабдоміолізу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ) [104].

Показники	Експериментальні групи			
	Контроль	Рабдоміоліз-1	Рабдоміоліз-3	Рабдоміоліз-6
SOD1, УО/мг протеїну	298±27	298±26	314±22	221±17*
Каталазна активність CAT, мкмоль $H_2O_2$ /хв/мг протеїну	191±21	197±25	113±13*	403±60*
Пероксидазна активність CAT, мкмоль FA/хв/мг протеїну	1,15±0,11	3,47±0,58*	0,88±0,15	2,96±0,48*

\*  $P < 0,05$  (відносно «Контролю»)

З таблиці видно, що прогресування патології не супроводжувалось значним підвищенням активності цитозольної ізоформи супероксидисмутази, SOD1. Це свідчить про те, що супероксид-аніони в цьому компартменті клітин ниркової тканини не є джерелом  $H_2O_2$  за прогресування рабдоміолізу.

Натомість, на 6-й день ми спостерігали незначне зниження активності ензиму, що можливо пов'язано зі зменшенням концентрації його субстрату, що, як наслідок, може призводити до зниження інтенсивності відновлення заліза (III) супероксид-аніонами за умов реакції Фентона, і, як наслідок, забезпечувати внесок до пролонгування потужності оксидативного стресу [140].

Відомо, що САТ є біфункційним ензимом, який, залежно від концентрації власного субстрату, може брати участь або в його катаболізмі (високі концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$ , каталазна реакція), або в пероксидазній низькомолекулярних сполук, таких як спирти (етанол, метанол), кислоти (форміат) та альдегіди (ацетальдегід) (низькі концентрації  $\text{H}_2\text{O}_2$ , пероксидазна реакція). При цьому зміни швидкостей каталазної та пероксидазної реакцій САТ залежать від стану організму і відбуваються різноскеровано [141]. Хоча САТ відносять до групи суїцидних ензимів (інактивування високими концентраціями власних субстратів), проте вона є надзвичайно стійкою до дії  $\text{H}_2\text{O}_2$  в межах  $10^{-9}$ - $10^{-2}$  М (власні дані, що не були опубліковані). На моделі досліджуваної патології було показано, що динаміка змін швидкостей каталазної та пероксидазної реакцій в нирці експериментальних тварин носить осциляторний характер. Так, на 1-у добу після введення гліцеролу, пероксидазна активність САТ збільшилася в 3 рази порівняно з контролем, тоді як каталазна активність ензиму не зазнавала змін (Табл.3.2). В цей же час, як зазначалось вище, в крові щурів зафіксовано багаторазове збільшення вмісту загального гемі та появу лабільного заліза (III), що призводило до індукування оксидативного стресу [54]. Про розвиток оксидативного стресу в організмі тварин за прогресування патології (на 3-й день) свідчать дані щодо багаторазового зростання таких показників як вміст ТБК-активних продуктів в печінці та СО-груп протеїнів плазми крові відносно контролю у 1,5 та 3 рази, відповідно [142]. Проте, саме у цей час, на 3-й день, ми спостерігали стрімке зниження майже у 2 рази каталазної активності САТ, що ймовірно пов'язано з надмірним навантаженням на цю

ланку антиоксидантного захисту і недостатністю необхідної її потужності для компенсування оксидативного стресу. Адаптивна відповідь антиоксидантної системи тварин в тканині нирки за умов потужного оксидативного стресу, пов'язаного з високим рівнем вмісту лабільного заліза (III) в крові тварин, схоже формувалась на 6-й день, коли рівні і каталазної, і пероксидазної активностей САТ зростали більше ніж у двічі. Це може свідчити про високі (проте не загрозливі для функціонування САТ) рівні  $H_2O_2$  на цьому етапі прогресування рабдоміолізу, що також позитивно корелювало з підвищенням активностей SSAO та PAO (Табл. 3.1 та 3.2), тобто ці ензими могли бути додатковим джерелом  $H_2O_2$ , що, як наслідок, призводило до пролонгування оксидативного стресу.

***- Оцінка рівнів активностей амінооксидаз та антиоксидантних ензимів в тимусі щурів за гліцерол-стимульованого рабдоміолізу***

Визначення морфологічних показників тимусу, ваги органу та загальної кількості клітин, продемонстрували тенденцію до їх зниження у щурів на 6-й день після введення гліцеролу (Табл. 3.3). Це може свідчити про індукування процесу акцидентальної інволюції центральної залози імунного захисту, адже більш виражені зміни морфологічних показників тимусу можуть виникати на пізніх етапах стресового стану організму.

**Таблиця 3.3.** Морфологічні показники тимусу щурів інтактних та на 6-й день прогресування рабдоміолізу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Показник	Експериментальні групи	
	Контроль	Рабдоміоліз-6
Вага, г	0,375±0,069	0,218±0,042
Загальна кількість клітин, $1 \cdot 10^8$	5,41±0,91	3,29±0,70

Результати дослідження динаміки змін активностей АОаз та антиоксидантних ензимів у тимоцитах, отриманих *ex vivo*, наведено у табл. 3.4-3.5.

В літературі описані дані стосовно того, що біогенні аміни відіграють важливу роль у функціонуванні імунних клітин тимусу. Зокрема показано, що зростання вмісту катехоламінів, серотоніну та гістаміну пригнічує імунні реакції [143]. Як видно з таблиці 3.4, активність SSAO в тимоцитах експериментальних тварин на 3-й та 6-й день розвитку рабдоміолізу підвищувалась у 2-2,5 рази відносно контролю, що може свідчити про високі рівні субстрату SSAO, метиламіну, продукту катаболізму катехоламінів. Водночас, підвищення рівня активності DAO у 4 рази порівняно з контролем може відбуватись внаслідок присутності в тимусі надмірних кількостей субстратів ензиму, гістаміну та путресцину. Таким чином, за умов прогресування рабдоміолізу вміст надлишкових кількостей зазначених біогенних амінів може призводити до пригнічення функцій тимусу, зокрема, та імунної реакції, загалом. На нашу думку, такий ефект можуть спричинювати продукти катаболізму цих сполук, що інтенсивно генеруються в реакціях за участі АОаз за цих умов.

**Таблиця 3.4.** Активність амінооксидаз у тимоцитах щурів за прогресування рабдоміолізу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ) [104].

Показники	Експериментальні групи			
	Контроль	Рабдоміоліз-1	Рабдоміоліз-3	Рабдоміоліз-6
SSAO, мкмоль $H_2O_2$ /хв/мг протеїну	4,82±0,82	1,55±0,42*	9,88±1,59*	10,5±2,4*
PAO, мкмоль $H_2O_2$ /хв/мг протеїну	1,62±0,46	-	5,62±1,35*	2,09±0,46
DAO, мкмоль $H_2O_2$ /хв/мг протеїну	1,21±0,27	-	5,5±1,07*	-

\*  $P < 0,05$  (відносно «Контролю»)

У свою чергу, обмін поліамінів має велике значення для Т-лімфопоезу. Так, сигнальний шлях регулювання клітинного росту Т-лімфоцитів mTORC2/c-Мус координує також транскрипцію ензимів біосинтезу поліамінів [144]. Крім того, результати наших попередніх досліджень

продемонстрували, що низькі концентрації поліамінів сприяли проліферуванню клітин, а високі виявляли цитотоксичний ефект [137]. Це повністю відповідає даним літератури, що рівні цих сполук в організмі підлягають жорсткому контролю в дуже вузьких межах, зокрема в тимусі. Проте, на 3-й день після індукування рабдоміолізу, в тимоцитах виявлено багаторазове збільшення активності PAO (у 3,5 рази, Табл. 3.4). Це може відбуватись внаслідок підвищення рівнів вищих поліамінів, спермідину та сперміну, які виявляють цитотоксичний ефект на тимоцити, як нормальні, так і апоптотичні [137].

Результати оцінювання пероксидазної активності САТ та загальної активності SOD (SOD1 + SOD2) в тимоцитах експериментальних тварин наведено у таблиці 3.5.

**Таблиця 3.5.** Активність антиоксидантних ензимів у тимоцитах щурів за прогресування рабдоміолізу ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ) [104].

Показники	Експериментальні групи			
	Контроль	Рабдоміоліз-1	Рабдоміоліз-3	Рабдоміоліз-6
Загальна активність SOD (SOD1 + SOD2), УО/мг протеїну	57±7	47±3	101±8*	158±12*
Пероксидазна активність САТ, мкмоль FA/хв/мг протеїну	26,4±5,1	24,9±8,2	39,5±10,1	26,6±4.9

\*  $P < 0,05$  (відносно «Контролю»)

Аналіз функціонування САТ в тимоцитах за даних умов ми проводили лише для її пероксидазної активності, оскільки, як було показано нами раніше, в тимусі щурів каталазна активність ензиму не детектується використаним спектрофотометричним методом [137]. Це може бути пов'язано скоріш за все з тим, що межа чутливості методу перевищує рівні  $H_2O_2$  в клітинах тимусу, хоча згодом було вирішено цю проблему та розроблено більш чутливий метод [121]. В той же час, слід зауважити, що

$H_2O_2$  та функціонування САТ-каталази, безумовно, відіграють суттєву роль у регулюванні функційної активності тимусу. Як видно з таблиці 3.5, достовірних змін рівня пероксидазної активності САТ за прогресування рабдоміолізу не спостерігалось. Ми припускаємо, що в тканині тимусу за цих умов дійсно присутні високі концентрації  $H_2O_2$ , додатковим джерелом яких можуть також виступати підвищені активності АОаз (Табл. 3.4). В такому випадку має відбуватись детоксифікування  $H_2O_2$  в каталазній реакції САТ, яку не детектували за згаданих причин.

На відміну від САТ-пероксидази, загальний рівень активності SOD вже на 3-й день розвитку патології перевищував цей показник у інтактних тварин майже у 2 рази, а на 6-й день - ~ в 3 рази (Табл. 3.5). Така невідповідність в детектованих рівнях ензиму в нирці та тимусі пов'язана, насамперед, з тим, що в першому випадку цей показник вимірювався лише в цитозолі (SOD1), тоді як у іншому – (SOD1 + SOD2). Це може свідчити, що за патологічних умов індукується також активування мітохондрійної ізоформи ензиму. Отримані раніше нами дані [137] продемонстрували, що за умов стимулювання апоптозу в тимоцитах спостерігається багаторазове зростання загального рівня активності SOD. Таким чином, в даному випадку ми припустили, що виявлені ефекти є наслідком апоптозу тимоцитів та інволюції тимуса, і пов'язали це з потужним оксидативним стресом, індукованим рабдоміолізом.

### **Висновок №1.**

Встановлено, що за умов індукованої гліцеролом ГНН багаторазове зростання активностей досліджених АОаз та антиоксидантних ензимів в нирці та тимусі відповідає ступеню важкості перебігу захворювання.

### **3.2. SSAO - маркер нефропатії за умов стрептозотоцин-індукованого діабету: внесок нітрозативного стресу**

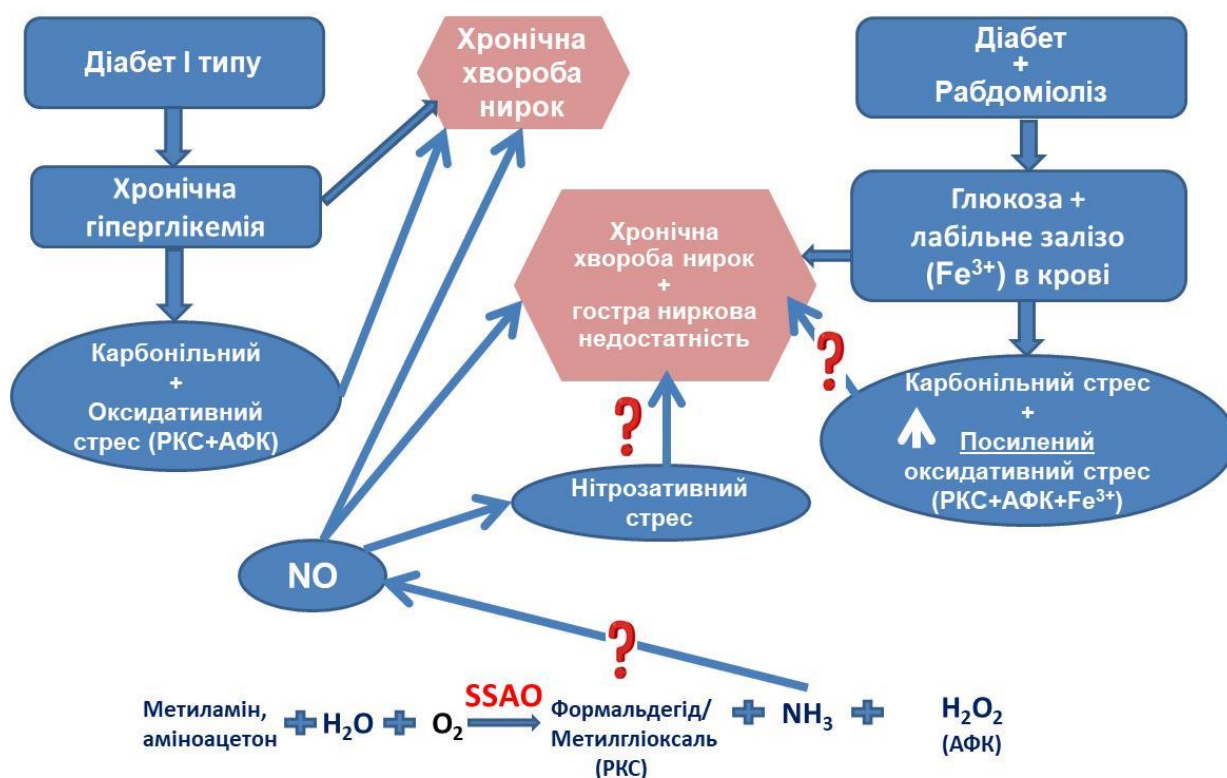
Для подальшого вивчення механізмів токсичності катаболічних продуктів біогенних амінів та поліамінів, які утворюються за присутності

АОаз, та участі цих чинників в патології нирки як органу-мішені, нами було обрано іншу модель захворювання, що супроводжується нефропатією, а саме, цукровий діабет з його ускладненням, хронічною (діабетичною) хворобою нирки (ДХН). Як зазначалось в підрозділі 1.3, п. *«Причетність оксиду азоту до патогенезу діабетичної хвороби нирки»*, участь оксидативного та карбонільного стресу у розвитку як діабету, так і ДХН, є підтвердженим фактом, тоді як внесок NO в цей процес досі остаточно не з'ясовано, хоча підтверджено наявність тісного зв'язку між метаболізмом АФК та АФА в організмі за цього стану. Водночас, розвиток та потужність кожного з видів стресу, викликаного надмірними кількостями відповідних високореактивних сполук, може мати свої регуляторні особливості. З метою з'ясування внеску до діабетичного стану чинників оксидативного стресу, одним з джерел якого є АОази, на етапі №2 дисертаційного дослідження було використано підхід, що дозволяв механістично посилити його потужність і полягав в індукуванні рабдоміолізу на тлі прогресування діабету (група *«Діабет+рабдоміоліз»* див. п. 2.1 *«Модель стрептозотоцин-індукованого діабету 1 типу»*). При цьому необхідно було оцінити потужність інших видів стресу та, по можливості, виявити регуляторні зв'язки між функціонуванням АОаз та метаболізмом АФА (Рис. 3.1).

На попередньому етапі роботи, з усіх досліджених АОаз саме рівень активності SSAO позитивно корелював зі ступенем розвитку патологічного стану рабдоміолізу в органі-мішені нирці. Крім нирки, ми зупинили свій вибір також на крові та печінці. При цьому керувались наступними міркуваннями. По-перше, рівень активності SSAO в плазмі є прийнятним клінічним маркером [145, 146]. По-друге, ураження нирки часто супроводжується розвитком хронічного захворювання печінки, і при цьому тканини обох органів стають схильними до кровотеч [36, 147]. По-третє, для такого системного захворювання як цукровий діабет характерними є важкі метаболічні розлади. Інтегрування та регулювання всіх обмінних процесів



здійснюється в головному метаболічному органі, печінці, що дає підстави вважати печінку також органом-мішенню цукрового діабету 1 типу [148].



**Рис. 3.1.** Узагальнена схема патогенезу нефропатії за експериментального діабету 1 типу та діабету, ускладненого рабдоміолізом.

Беручи до уваги сказане вище, основним завданням етапу досліджень на моделі стрептозотоцин-індукованого діабету та діабету, ускладненого рабдоміолізом, у щурів було проаналізувати зміни активностей SSAO, про-та антиоксидантних ензимів (XO, SOD1, CAT і GPx), а також показників нітрозативного стресу в нирці, крові та печінці піддослідних тварин.

– *Оцінювання рівня активності SSAO в тканинах щурів за умов стрептозотоцин-стимульованого цукрового діабету та діабету, ускладненого рабдоміолізом*

Ступінь розвитку цукрового діабету у експериментальних тварин оцінювали за вмістом в крові глюкози, який був підвищений у 4,2 (27,0±8,0 мМ) порівняно з контролем [149]. Водночас, зростання у 3 рази відносно контрольної групи концентрації карбоксиметиллізину, одного з кінцевих

продуктів неензиматичного глікування протеїнів, в плазмі крові щурів з діабетом [149], свідчило про наявність в організмі цих тварин ускладнень патології, однією з яких є нефропатія [150].

При цьому, як ми і очікували, в нирці, а також в крові щурів з діабетом спостерігалось підвищення рівня активності SSAO (у 3 та 1,4 рази, відповідно), тоді як в печінці хворих тварин - лише тенденція до зростання цього показника порівняно з контролем (Табл. 3.6). В літературі є дані про причетність SSAO до ниркових і судинних захворювань як ускладнень за умов гострої та хронічної гіперглікемії, що пов'язано з генеруванням надмірних кількостей продуктів реакції окисного дезамінування первинних амінів за участі цього ензиму, формальдегіду та пероксиду водню, відомих своєю уремичною токсичністю [105, 151].

**Таблиця 3.6.** Активність SSAO в нирках, крові та печінці щурів за STZ-стимульованого цукрового діабету та діабету, ускладненого рабдоміолізом ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ).

Тканина	Активність, мкмоль $H_2O_2$ /хв/мг протеїну		
	Експериментальні групи		
	Контроль	Діабет	Діабет+рабдоміоліз
Нирка	0,36 ± 0,05	1,09 ± 0,18 *	0,71 ± 0,12 **
Кров	0,13 ± 0,02	0,18 ± 0,03 *	0,17 ± 0,02 *
Печінка	0,79 ± 0,15	0,96 ± 0,18	0,65 ± 0,13

\*  $P < 0,05$  відносно «Контролю», \*\*  $P < 0,05$  відносно «Діабету»

Таким чином, підвищення рівня активності даного ензиму в нирці щурів за діабету, яке ми продемонстрували в даному експерименті, може свідчити про розвиток у тварин патології органу, ДХН. Зростання рівня активності ензиму в плазмі (розчинна форма) є результатом вивільнення позаклітинного фрагменту молекули мембранозв'язаної форми SSAO, що містить каталітичний центр, з пошкодженої тканини, в нашому випадку нирки та печінки [36]. Саме з цієї причини цей показник використовується як клінічний маркер для оцінки ступеня ураження тканин органів-мішеней за умов розвитку низки патологічних станів.

Від механістичного комбінування діабету та рабдоміолізу у щурів ми очікували отримати адитивний ефект щодо активності SSAO, адже обидва патологічні стани супроводжуються ураженням ниркової тканини з розвитком ДХН та ГНН, відповідно. Проте індукування рабдоміолізу у діабетичних тварин призвело до несподіваних наслідків. В нирці рівень активності ензиму достовірно знижувався, в крові залишався незмінним порівняно з цим показником в групі тварин з цукровим діабетом, тоді як в печінці спостерігалась тенденція до зниження (Табл. 3.6). При цьому ступінь тяжкості діабету та його ускладнень залишався таким же, як і в групі «Діабет», про що свідчила відсутність достовірних змін вмісту карбоксиметиллізину [149].

Такий незрозумілий ефект потребував пояснення. І першим кроком на цьому шляху стало з'ясування внеску оксидативного стресу до розвитку діабету в організмі експериментальних тварин.

***– Оціювання маркерів оксидативного стресу та рівнів активностей про- та антиоксидантних ензимів в тканинах щурів за умов стрептозотоцин-стимульованого цукрового діабету та діабету, ускладненого рабдоміолізом***

З цією метою було проведено вимірювання вмісту вільних радикалів в зразках плазми крові щурів за допомогою ЕПР аналізу, який є прямим методом визначення вмісту цих сполук в тканинах тварин та людини. Потрібно зазначити, що в спектрі ЕПР крові сигнал  $g=2,00$  дають всі сполуки вільнорадикальної природи з часом життя більше  $10^{-7}$  с, тобто АФК + АФА, виокремити кожен з яких в цих зразках неможливо. Так, у тварин з діабетом виявлено збільшення вмісту вільних радикалів в крові у 1,6 рази порівняно з контролем, що вказує на інтенсифікацію вільнорадикальних реакцій внаслідок активації метаболізму при імунній відповіді організму на введення STZ. Крім того, в крові цих тварин зафіксовано появу невеликої кількості лабільного заліза ( $Fe^{3+}$ ), яке було абсолютно відсутнє у інтактних тварин (Табл. 3.7). З одного боку, наявність  $Fe^{3+}$  в крові діабетичних тварин є

маркером пошкодження м'язової тканини, що свідчить про потенціювання ускладнень патології, а з іншого, це лабільне залізо виступає каталізатором окисних процесів, в яких генеруються АФК.

**Таблиця 3.7.** Аналіз спектрів ЕПР зразків плазми крові щурів з STZ-індукованим діабетом та діабетом, ускладненим рабдоміолізом ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

EPR параметри	Експериментальні групи		
	Контроль	Діабет	Діабет+рабдоміоліз
Fe <sup>+3</sup> , мг/л	0	0,3±0,1	2,3±0,7 <sup>*,**</sup>
Вільні радикали, *10 <sup>19</sup> н.е./л	5,4±0,8	8,6±1,9 <sup>*</sup>	14,0±3,0 <sup>*,**</sup>

\*  $P < 0,05$  відносно «Контролю», \*\*  $P < 0,05$  відносно «Діабету».

Потрібно зазначити, що іншою дослідницькою групою відділу в цьому експерименті було виявлено зростання у тварин з діабетом у 2-3 рази відносно контролю інших маркерів окисдатовно/карбонільного стресу: ТБК-активних продуктів та загального вмісту альдегідів в печінці, вмісту СО-груп протеїнів в плазмі крові та печінці, а також ступеня неензиматичного глікування колагену шкіри, при цьому вміст SH-груп протеїнів в печінці знижувався у такому ж ступені [149].

Індукування рабдоміолізу у діабетичних щурів стимулювало появу в крові додаткової великої кількості Fe<sup>3+</sup> (у 7,7 разів) та, як наслідок, збільшення в цій тканині кількості вільних радикалів (в 1,6 рази) відносно групи «Діабет» (Табл. 3.7). Ці дані підтвердили правильність вибору для експерименту моделей та їх комбінування з метою посилення окисдатовного стресу.

Наступним етапом в оцінюванні ступеня розвитку окисдатовного стресу в організмі експериментальних тварин було визначення рівнів активностей про- та антиоксидантних ензимів (ХО, SOD1, CAT і GPx, табл. 3.8). Як відомо, багаторівнева антиоксидантна система клітин забезпечує їх захист від загибелі внаслідок пошкодження вільними радикалами внутрішньоклітинних структурних компонентів, тоді як порушення окисно-відновного балансу є чинником ризику виникнення цих негативних подій.

**Таблиця 3.8.** Активність про- та антиоксидантних ензимів в тканинах щурів зі STZ-індукованим діабетом та діабетом, ускладненим рабдоміолізом (M ± m, n=5)

Тканина	Показник	Експериментальні групи		
		Контроль	Діабет	Діабет+ рабдоміоліз
Кров	ХО, мкмоль сеч. к./хв/мг протеїну	0,52±0,07	1,62±0,22 <sup>*</sup>	0,65±0,12 <sup>**</sup>
	SOD1, Ум. од/ мг протеїну	486±60	305±43 <sup>*</sup>	485±60 <sup>**</sup>
	CAT, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	71±7	65±7	49±3 <sup>*,**</sup>
Печінка	ХО, мкмоль сеч. к./хв/мг протеїну	1,03±0,11	1,37±0,12 <sup>*</sup>	0,93±0,1 <sup>**</sup>
	SOD1, Ум. од/ мг протеїну	496±46	423±65	375±37 <sup>*</sup>
	CAT, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	300±23	206±25 <sup>*</sup>	275±16 <sup>**</sup>
	GPx, мкмоль GSH/хв/мг протеїну	0,46±0,04	0,77±0,09 <sup>*</sup>	0,42±0,05 <sup>**</sup>
Нирка	ХО, мкмоль сеч. к./хв/мг протеїну	0,51±0,07	0,50±0,07	0,88±0,15 <sup>*,**</sup>
	SOD1, Ум. од/ мг протеїну	374±31	345±24	403±27
	CAT, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	170±7	124±9 <sup>*</sup>	109±11 <sup>*</sup>
	GPx, мкмоль GSH/хв/мг протеїну	0,40±0,04	0,30±0,03 <sup>*</sup>	0,48±0,05 <sup>**</sup>

\* P<0,05 відносно «Контролю», \*\* P<0,05 відносно «Діабету»

Так, було виявлено, що активність про/антиоксидантних ензимів значно змінювалася у зразках крові та печінки тварин з діабетом відносно інтактних щурів (Табл. 3.8). Ці дані свідчать, що додатковою причиною індукування оксидативного стресу є посилення продукування супероксид-аніонів за рахунок підвищення активності ХО, некомпенсованої функцією SOD1 в печінці і, особливо, в крові (втричі) (Табл. 3.8). У той же час,

антиоксидантний захист у печінці може частково опосередковуватись активністю GPx.

І знову ж таки, після введення тваринам з цукровим діабетом гліцеролу, крім нормалізації активності SSAO в тканинах щурів, спостерігалось також відновлення рівнів активностей про- та антиоксидантних ензимів до їх значень у контролі (XO та SOD1 – у крові, XO, CAT та GPx – в печінці, GPx – в нирці), натомість в нирці, одному з основних органів-мішеней діабету, зафіксовано зростання рівня активності XO у 1,7 рази відносно груп «контроль» і «діабет» (Табл. 3.8).

Той самий ефект, нормалізування згаданих вище показників оксидативно/карбонільного стресу в цій групі щурів відносно групи «Діабет» виявили також наші колеги [149].

Таким чином, оцінювання ступеня оксидативного стресу, так само як і рівня карбонільного стресу, в організмі експериментальних тварин залишило відкритим питання щодо механізму нормалізування профілю біохімічних показників за умов індукування рабдоміолізу на тлі прогресування цукрового діабету. Крім того, визначення вмісту вільних радикалів в плазмі крові експериментальних тварин не дало змоги оцінити внесок окремо кожного з класів вискорективних сполук, АФК та АФА, до розвитку досліджуваної патології та її ускладнень. Тому, наступним кроком у вирішенні цієї проблеми стало визначення показників, що характеризують метаболізм АФА в організмі тварин, оскільки, як зазначалось вище, ця ланка метаболізму є залученою до регулювання основних функцій нефрону як за умов норми, так і за діабету.

***–Характеристика чинників нітрозативного стресу в тканинах щурів за умов стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету та його ускладнення рабдоміолізом***

Радикальна природа NO робить його здатним реагувати з різноманітними сполуками, проте з різним ступенем сили взаємодії, слабким по відношенню до тіолів і амінів, проте високим щодо заліза, O<sub>2</sub> і особливо з

супероксиду ( $O_2^-$ ). Це обмежує час життя та діапазон дії NO. Період його напівжиття в крові складає 0,05-1,8 мс, тоді як час життя  $\sim 1$  мкс, 1 мс та 1 с відповідає відстаням його дифундування приблизно на 0,1, 2 та 80 мкм, відповідно [105, 152]. NO досить швидко утворює комплекси з залізом гема, зокрема у складі Hb за умов гіпоксії (нітрозилгемоглобін (HbNO)), з негемовим залізом у складі FeS-кластерів протеїнів (ДНКЗ) та з іншими металами перехідної валентності у складі протеїнів, що призводить до формування досить стабільних сполук з парамагнітними властивостями. До них належить також метгемоглобін (MetHb), продукт окиснення оксидом азоту гемового заліза Hb до  $Fe^{3+}$  за умов нормальної оксигенації [105, 153, 154]. В плазмі крові NO активно залучається до процесу нітрозилювання тирозинових залишків протеїнів, а утворений при цьому 3-нітротирозин (3-NT) вважається маркером патологічного стану організму, який ініціюється/супроводжується розвитком потужного оксидативно/нітрозативного стресу [105, 155].

Таким чином, рівень нітрозативного стресу в організмі прийнято оцінювати або за вимірюванням в крові та тканинах концентрації безпосередньо NO з попереднім введенням його пасток (в представленому дослідженні їх не використовували), або за наступними маркерами: Hb-NO, MetHb, та 3-NT плазми крові та ДНКЗ в тканинах. Результати детектування цих показників відповідними методами (див. розділ 2 «Матеріали та методи дослідження») в тканинах щурів всіх експериментальних груп наведено у табл.3.9 та на рис. 3.2.

Дійсно, за діабету у тварин було виявлено ознаки потужного нітрозативного стресу. А саме, в крові діабетичних щурів ми виявили появу HbNO за відсутності цієї сполуки у інтактних тварин, підвищення майже в 2 рази вмісту MetHb та в 1,8 рази рівня 3-NT, багаторазове, 15-кратне, збільшення ДНКЗ (Табл. 3.9, Рис 3.2). Мішенню атаки ендogenous NO можуть бути критично важливі для підтримки життєздатності та функційної активності клітин ензими, що містять гем та FeS-кластери. До таких ензимів

належать розчинна гуанілілциклаза, CYP450, ензими мітохондрійного ЕТЛ, рибонуклеази, тощо [105, 156]. При цьому ми виявили, що в печінці тварин з діабетом інші потенційні мішені NO, а саме, протеїни, що містять центри з  $Mn^{+2}$ -,  $Cu^{+2}$ - і  $Mo^{+7}$ , а також CYP450 залишилися практично незмінними (Табл. 3.9).

**Таблиця 3.9.** Дані ЕПР-аналізу зразків крові та печінки щурів зі STZ-індукованим діабетом та діабетом, ускладненим рабдоміолізом ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ) [105]

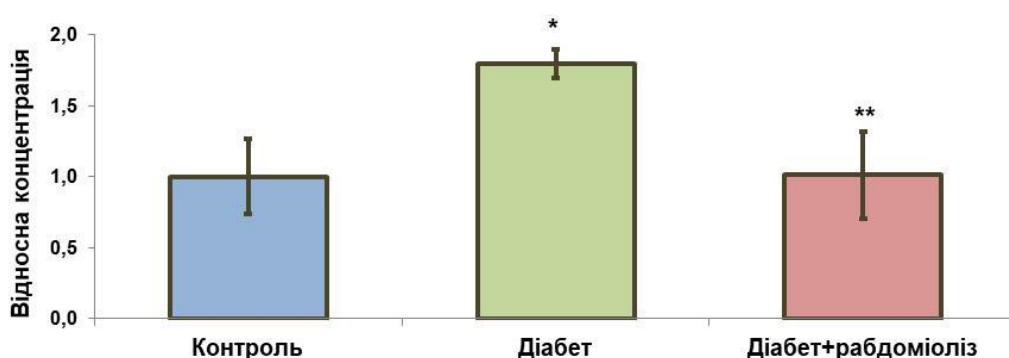
ЕПР-параметри	Експериментальні групи		
	Контроль	Діабет	Діабет+рабдоміоліз
Кров			
MetHb, г/л	0,77±0,12	1,3±0,3*	1,8±0,5*
HbNO, мкМ	0	2,6±0,5	3,5±0,7
Печінка			
ДНКЗ, мг/л	0,21±0,07	3,1±0,6*	8,2±2,2*
CYP450, відносні одиниці	1,0±0,2	1,2±0,3	0,97±0,3
$Mn^{+2}$ -зв'язані центри, відносні одиниці	1,0±0,1	1,0±0,2	0,97±0,21
$Cu^{+2}$ -зв'язані центри, відносні одиниці	1,0±0,2	0,89±0,23	0,87±0,22
$Mo^{+7}$ -зв'язані центри, відносні одиниці	1,0±0,1	1,2±0,3	0,95±0,21
Мітохондрійні убіхінони та семіхінони, відносні одиниці	1,0±0,1	0,75±0,16*	0,67±0,12*
Мітохондрійні FeS-центри, відносні одиниці	1,0±0,1	0,82±0,18*	0,76±0,13*

\*  $P < 0,05$  до Контролю

Зазвичай перетворення FeS-кластерів мітохондрійних протеїнів в ДНКЗ за дії надлишку NO є дуже руйнівним та може бути причиною суттєвого пошкодження цих органел. Сигнали ЕПР, що пов'язані з мітохондрійними процесами, відповідають кількості радикалів, які генеруються убіхіноновими та семіхіноновими ділянками ЕТЛ, і є на кілька порядків сильнішими за ті, що пов'язані з окисними процесами [105, 156]. Стан мітохондрійних електрон-транспортних структур у зразках тканини печінки можна оцінити за сигналами вільних радикалів семіхінону ( $g=2,00$ ) та FeS центрів ( $g=1,94$ ), які



приймають електрони від убіхінонів. Згідно отриманих результатів (Табл. 3.9), величина цих сигналів свідчить про їх високу зворотну кореляцію з вмістом нітрозильних комплексів у крові та печінці ( $r=0,95-0,98$ ). Таким чином, дані ЕПР-аналізу показують зниження в мітохондріях печінки діабетичних щурів порівняно з контролем кількості вільних радикалів у 1,3 рази та у 1,2 рази вмісту залізо-сірчаних центрів, які є джерелом ДНКЗ. Отримані результати відображають також значне зниження швидкості переносу електронів в мітохондрійних ЕТЛ за даної патології (Табл. 3.9).



**Рис. 3.2.** Рівень 3-нітротирозину в плазмі крові тварин зі стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом та цукровим діабетом, ускладненим рабдоміолізом ( $M \pm m$ ,  $n=5$ , \*  $P < 0,05$  до Контролю, \*\*  $P < 0,05$  до Діабету) [105].

Трансформуванню FeS-центрів на ДНКЗ за присутності надлишку NO може піддаватися достатньо велика кількість різних протеїнів, зокрема ензимів, і в цьому випадку пригнічується їх каталітична активність. Але цей процес є оборотним, оскільки задля компенсації небезпечного пошкодження NO структурних компонентів в клітинах еволюціонували відповідні складні системи [105, 157]. Так, NADH-цитохром-b5-редуктаза 3 (NADH-метгемоглобінредуктаза) метаболізує MetHb та обмежує його накопичення. ДНКЗ також відновлюються та замінюються на нормальні FeS кластери. Цей процес є загальним та допомагає протидіяти токсичному впливу NO. Крім того, оборотне утворення достатньо стабільних HbNO і ДНКЗ забезпечує зберігання і перенесення молекул NO в клітинах і тканинах, тоді як за

цукрового діабету токсична дія NO може бути прологована NO-радикалом. Цей баланс залежить від кисневого статусу та рівня MetHb, оскільки за умов його підвищення більш ніж на 30% від загального вмісту гемоглобіну виникають симптоми гіпоксії [105, 154, 158, 159]. Отримані результати свідчать, що вміст MetHb в крові діабетичних тварин збільшувався відносно контролю майже на 70% (Табл.3.9), тобто тканини знаходились в умовах значного дефіциту кисню.

За умов накладання рабдоміолізу на діабетичний стан у щурів зберігались симптоми гіпоксії, MetHb в крові залишався на тому ж рівні, що й у тварин з діабетом (Табл.3.9). При цьому суттєве збільшення ДНКЗ у зразках печінки у тварин з ускладненим діабетом (у 2,6 рази порівняно з групою «Діабет») за умов гіпоксії свідчить, що ці комплекси є досить стабільними, тому вони не можуть вивільняти NO. Це впливає на доступність цієї сполуки для інших процесів за таких умов, що й може пояснити відсутність додаткового достовірного зростання MetHb та HbNO (Табл. 3.8), а також зниження ступеня нітрування тирозину в протеїнах плазми крові до нормального рівня в групі «Діабет+рабдоміоліз» (Рис. 3.2). Ми припускаємо, що відсутність вільного NO в тканинах також було основною причиною нормалізування низки біохімічних показників. За комбінованого патологічного стану спостерігалось подальше зниження інтенсивності обох мітохондрійних сигналів (залізо-сірчаних центрів та убіхінонів), тоді як інші потенційні мішені NO в печінці залишалися незмінними (Табл. 3.9). Це свідчить про перетворення FeS-кластерів мітохондрійних протеїнів на ДНКЗ за участі оксиду азоту, які є основною мішенню даної АФА за цих умов.

Таким чином, індукування рабдоміолізу у щурів з глибоким діабетом призводило одночасно як до посилення нітрозативного стресу з утворенням комплексів NO з залізом (II/III), так і до зниження доступності вільного NO для посттрансляційної модифікації протеїнів та окисних процесів, що позитивно корелювало з функціонуванням прооксидантних ланок

метаболізму, зокрема окисного дезамінування первинних амінів за участі SSAO в усіх досліджених тканинах.

Це додатково вказувало на можливість існування регуляторного зв'язку між функціонуванням АОаз, як джерела АФК і РКС, та метаболізмом АФА. З метою пошуку такого зв'язку ми знов звернулись до реакції окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів й дійшли висновку, що третьому продукту реакцій за участі АОаз, амонію, не приділялось достатньо уваги дослідників з точки зору його потенційної небезпеки для нирки, зокрема за умов прогресування захворювань, органом-мішенню яких є цей орган, зокрема при цукровому діабеті. У той же час, відомо, що амоній є ключовим компонентом азотного гомеостазу, особливо в нирці. Швидкість синтезу/виведення азоту разом з внутрішньонирковим розподілом цієї сполуки між сечею та кров'ю є головним чинником регулювання кислотно-лужного балансу в нирці. Крім того, амоній є джерелом азоту для всіх амінокислот, зокрема азот аміаку включається в аргінін під час орнітинового циклу в нирці, після чого ця синтезована амінокислота вивільняється в ниркову вену і переноситься до всіх тканин і клітин [105, 160]. Підтримка рівня аргініну в плазмі крові безпосередньо залежить від його біосинтезу в нирці, який локалізується в її проксимальних звивистих каналцях, на відміну від проксимальних прямих каналців, де швидкість цього процесу знижена [105, 161].

Постійна і досить значна кількість аргініну в організмі використовується для синтезу NO. З іншого боку, аргінін є також попередником поліамінів, продукти катаболізму яких за участі відповідних АОаз виявляють доведену уремичну токсичність [105, 162]. Більш того, відомо, що за хронічних хвороб, зокрема цукрового діабету, також стимулюється і амонієгенез, внаслідок чого виникає гіпертрофія нирки, що може призвести до її ураження [163]. Тобто, в нирці за умов патології підвищені концентрації амонію та NO можуть бути причиною нефротоксичності, деструкції ниркової тканини та розвитку її фіброзу.

Враховуючи, що в нирці локалізація амонієгенезу та синтезу аргініну просторово зближені, можна припустити, що SSAO, яка за умов патологічного стану робить внесок до амонієгенезу, може бути джерелом синтезу надмірних кількостей NO, тобто нітрозативного стресу.

## **Висновок 2.**

За умов моделювання цукрового діабету 1 типу у щурів виявлено багаторазове підвищення рівня активності SSAO в нирці та крові, що позитивно корелювало зі ступенем оксидативно/карбонільного та нітрозативного стресу, насамперед, рівнем вільного NO.

### **3.3. Дослідження метаболічних шляхів біотрансформації, причин та меж токсичності семікарбазиду**

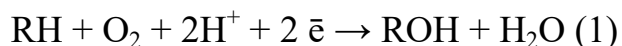
Результати, отримані в рамках попередніх етапів роботи, продемонстрували наявність позитивної кореляції між рівнями активностей АОаз та ступенем важкості захворювань нирки, а також окисно-відновним станом організму піддослідних тварин. Для підтвердження безпосередньої причетності АОаз до розвитку досліджуваних патологічних станів організму ми вирішили застосувати методичний підхід, спрямований на інгібування активностей цих ензимів *in vivo*. Свій вибір зупинили на необоротному інгібіторі мідь-вмісних АОаз, семікарбазиді (див. п.1.4). Слід зазначити, що використання специфічних інгібіторів ланок метаболічних мереж для корегування проявів патологічних станів, що супроводжуються їх гіперактивуванням, є загальноприйнятим терапевтичним підходом. Проте, враховуючи суттєві обмеження використання цієї сполуки в клініці, завданням етапу №3 дисертаційної роботи стало дослідження механізму біотрансформації SC, а також причин та меж його токсичності в досліді *in vitro*.

#### **- Участь цитохромів P-450 печінки в метаболічному перетворенні SC**

В попередніх експериментах, що проводились у відділі регуляції обміну речовин, з моделювання у щурів патологічного стану латиризму шляхом

хронічного введення тваринам 10 мМ SC було показано, що за цих умов спостерігалось зниження маси печінки дослідних тварин та збільшення в ній на 20% вмісту CYP450 [164]. Це дозволило зробити припущення про потенційну участь цієї родини ензимів в біотрансформації SC.

CYP450 переважно каталізує монооксигеназну реакцію, в результаті якої один атом кисню переноситься на органічний субстрат, а другий атом відновлюється до води (1) [109].

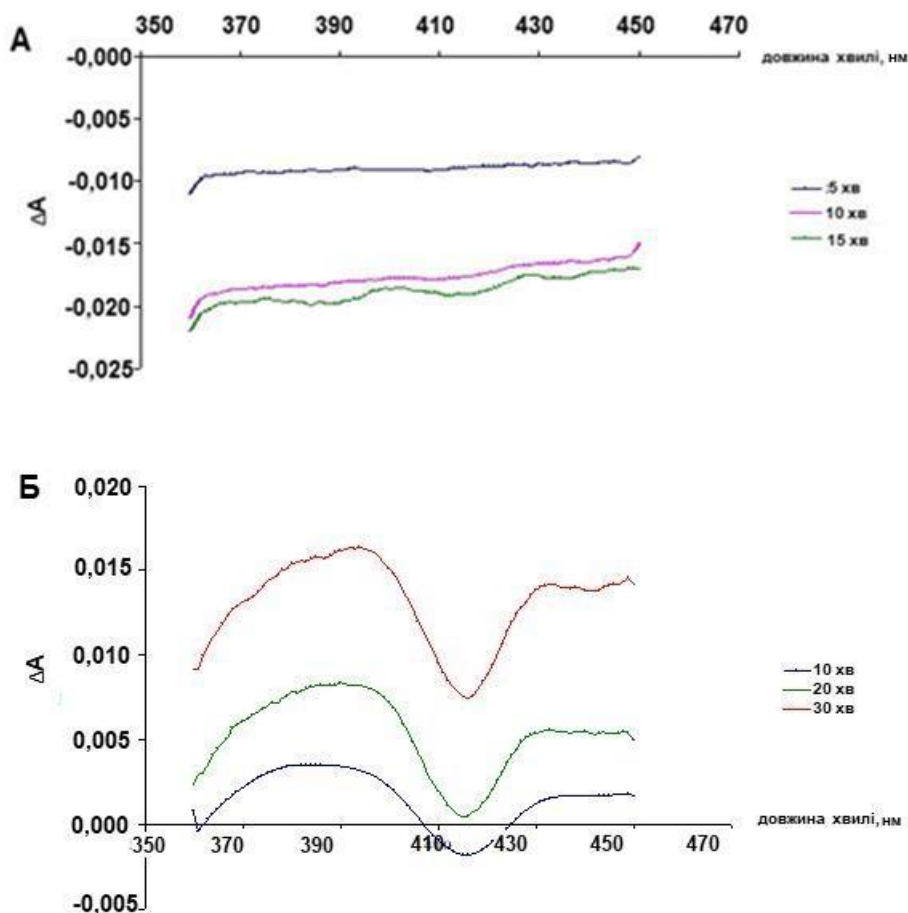


Для доказу участі CYP450 печінки в біотрансформації SC було використано метод диференційної спектрофотометрії [109]. Враховуючи клітинну локалізацію цих ензимів, експерименти проводили з використанням мікросомної фракції печінки щурів.

Зв'язування субстратів окисненою формою ензиму відбувається безпосередньо за участі гему, що призводить до змін його спектральних характеристик, моніторинг яких здійснювали за допомогою сканувального спектрофотометра. У CYP450, залежно від субстрату, можуть з'являтися три типи спектральних змін, які в диференційному спектрі поглинання характеризуються специфічними максимумом і мінімумом за певних довжин хвиль. Приєднання субстрату за одним із можливих типів зв'язування призводить до зміни спінового стану гема, в результаті чого має місце зсув смуги Sore в той чи інший бік [109].

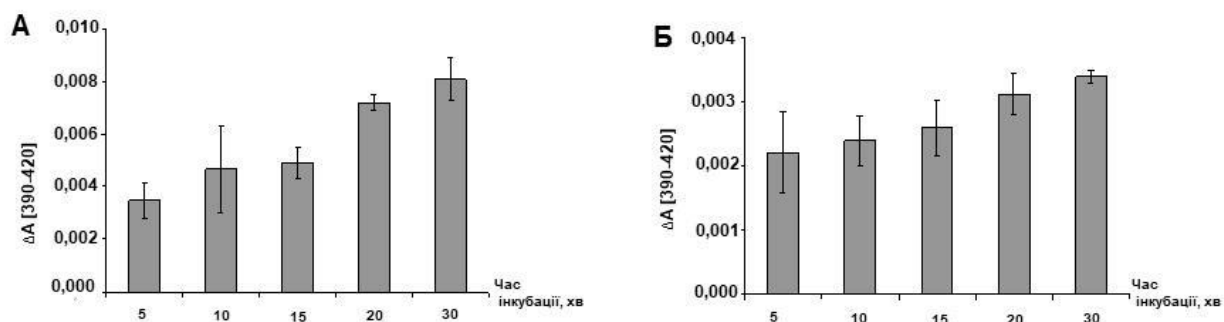
Спектри зчитувалися за відсутності та в присутності семікарбазиду в широких межах концентрацій від 0,05 мМ до 10 мМ. Диференційні спектри розраховувалися відніманням вихідного спектру зі спектрів, отриманих через певні часові проміжки. В диференційних спектрах мікросомної фракції печінки щурів за відсутності субстрату не спостерігалось ніяких змін (Рис. 3.3.А), тоді як присутність SC викликала появу піку при 390 нм та мінімуму при 420 нм (Рис. 3.3.Б), що відповідало I типу зв'язування субстрату з CYP450, для якого характерним є перехід гема ензиму з низькоспінового

стану в високоспіновий із специфічним зсувом смуги Core і утворення активного інтермедіату каталітичного циклу [109].



**Рис. 3.3.** Диференційні спектри мікросомної фракції печінки за відсутності семікарбазиду (А) та за умов її взаємодії з 3 мМ субстратом (Б) [109].

Індукована в певні часові проміжки максимальна зміна абсорбції, що спостерігалась за умов утворення ензим-субстратного комплексу, визначається шляхом віднімання мінімального значення абсорбції кожного диференційного спектру з максимального (420 і 390 нм, відповідно) і носить лінійний характер. Це мало місце лише за концентрації семікарбазиду в межах 1,5-7,5 мМ (Рис. 3.4), тоді як присутність у середовищі інкубування субстрату з концентрацією менше 1,5 мМ (0,66 мкмоль/мг протеїну мікросомної фракції печінки щурів) таких змін не викликала [109].



**Рис. 3.4.** Залежність максимальної зміни абсорбції середовища інкубації мікосомної фракції печінки щурів з 3 мМ (А) та 7 мМ (Б) семикарбазидом від часу [109].

Таким чином, отримані на цьому етапі експериментальні дані дозволяють стверджувати:

1. Метаболічне перетворення SC відбувається за участі СYP450в печінці.
2. Зв'язування SC в діапазоні концентрацій 1,5-7,5 мМ з СYP450 викликає спектральні зміни I типу, для якого є характерним перехід гема ензиму з низькоспінового стану в високоспіновий зі специфічним зсувом смуги Core і утворенням активного інтермедіату каталітичного циклу.
3. Концентрацію SC до 1,5 мМ (0,66 мкмоль/мг протеїну мікосомної фракції печінки щурів) можна вважати нижчою за оптимальний поріг, при якому має місце утворення ензим-субстратного комплекс та його ензиматичне перетворення.

У всіх подальших дослідженнях на етапі №3 роботи ми використовували 7,5 мМ концентрацію SC.

***- Гіпотетичний механізм та продукти метаболічного перетворення семикарбазиду***

Надалі було висунуто гіпотезу стосовно механізму біотрансформації SC в організмі ссавців з утворенням відповідних продуктів (Рис. 3.5). Підґрунтям для цього стали наступні дані літератури:

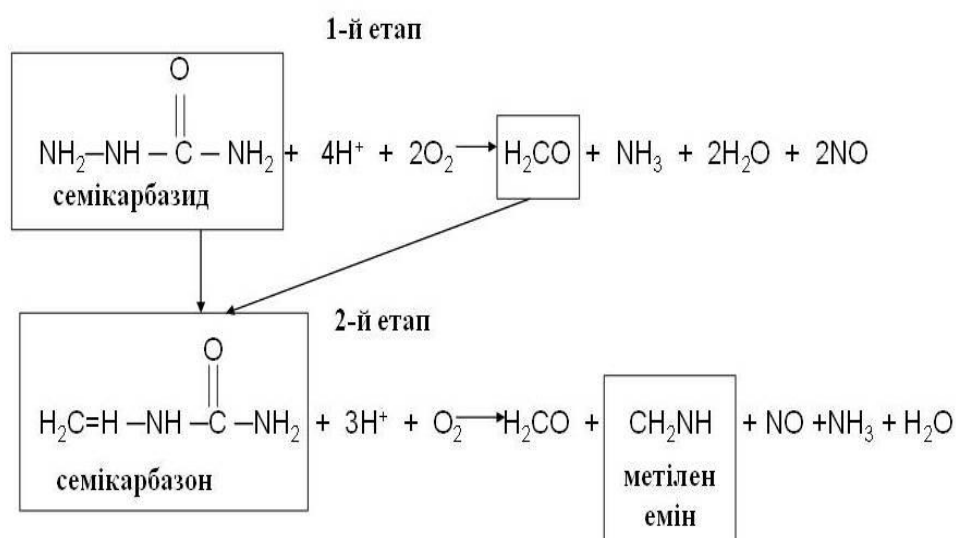
1. SC при потраплянні в організм в незміненому вигляді не екскретується [165].

2. Через 24 години після введення щурам SC (в/ч 100 мг/кг ваги) спостерігалось 4-кратне збільшення екскреції аміаку з сечею відносно цього показника до початку експерименту, тобто аміак може бути продуктом деградації даної речовини [166].

3. В досліді *in vitro* з дослідження біотрансформації карциногену нітрозодиметиламіну (NDMA) фракцією S9 печінки щурів (CYP450), з метою підтвердження продукування формальдегіду в монооксигеназній реакції автори використовували його пастку SC. При цьому спостерігалось не зменшення кількості FA, а, навпаки збільшення [108]. Це свідчило, що FA також може бути продуктом розкладання семікарабазиду CYP450.

Беручи до уваги структурну формулу SC, можна припустити існування 2-етапного шляху його розкладання. Гіпотезу проілюстровано на рис. 3.4. Продуктами окислення SC можуть бути крім FA та амонію, також NO. При цьому з 2 M SC має утворитись 1 M FA, 2 M амонію та 3 M NO [109].

Для ідентифікування продуктів реакції розкладення SC мікросомною фракцією печінки ми використовували умови запропоновані у публікації [108] та описані у розділі «Матеріали та методи досліджень».



**Рис.3.5.** Гіпотетичний механізм біотрансформації семікарбазиду [109]

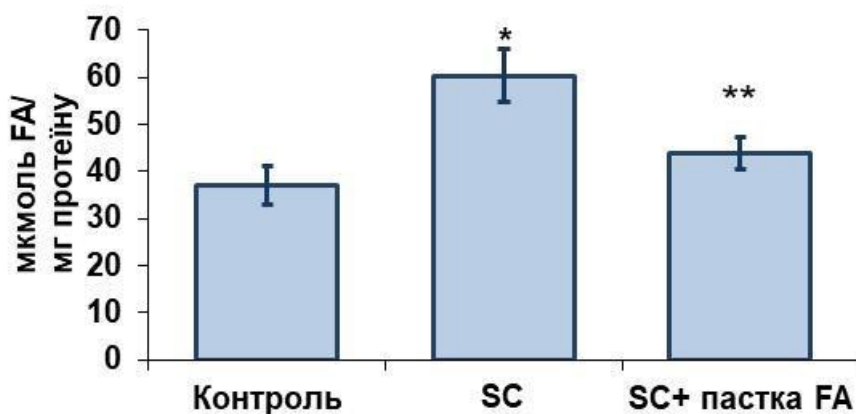


Для додаткового підтвердження припущення про причетність цитохромів P-450 печінки до процесу метаболічного перетворення SC було проведено одночасне визначення FA як продукту реакції розкладання NDMA та SC мікросомною фракцією печінки щурів. Ми показали, що швидкість утворення FA в даній реакції з 7,5 мМ SC і 5 мМ NDMA були одного порядку (Табл. 3.10).

У процесі трансформації 7,5 мМ SC протягом 15 хв утворювався FA в кількості  $22,0 \pm 7,1$  мкмоль/мг протеїну відносно контролю, який не містив субстрату. Для підтвердження присутності FA в реакційній суміші додатково використовували його пастку, димедон [109, 111] (Рис .3.6).

**Таблиця 3.10.** Порівняння швидкості утворення формальдегіду як продукту перетворення SC і NDMA мікросомами печінки щурів ( $M \pm m$ ) [109]

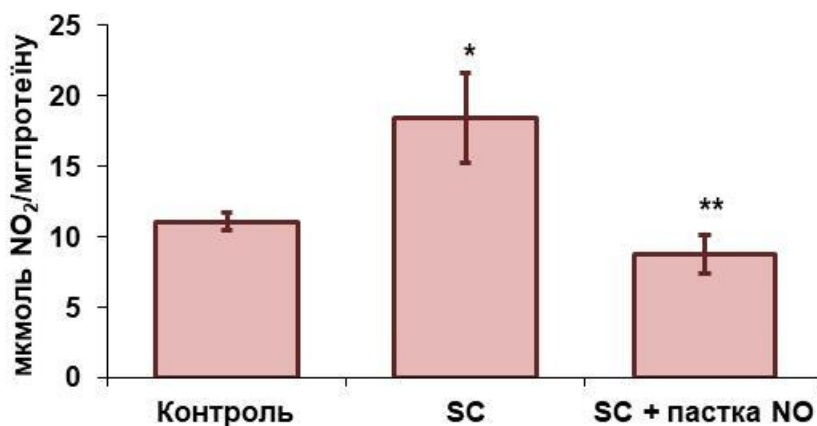
Субстрат	FA, мкмоль/хв/мг протеїну
NDMA	$2,43 \pm 0,78$ (n=5)
SC	$1,47 \pm 0,47$ (n=7)



**Рис. 3.6.** Утворення формальдегіду (FA) під час метаболічного перетворення 7,5 мМ семікарбазиду (SC) мікросомами печінки щурів протягом 15 хвилин (\* $P < 0,05$  відносно Контролю (без SC), \*\*  $P < 0,05$  щодо SC) [109].

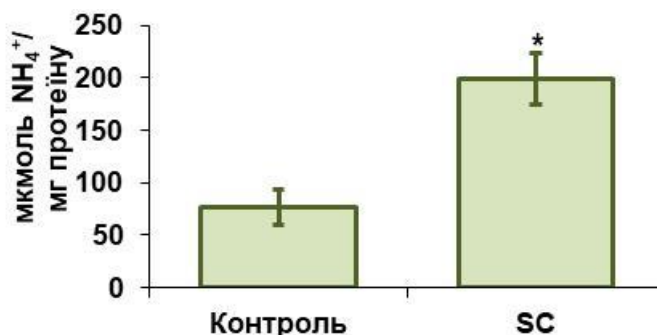
Продуктування NO визначали за накопиченням нітриту в реакційній суміші [109, 112], кількість якого при інкубації SC з мікросомами за той же

час була дещо менше, ніж FA і складала  $(11,3 \pm 1,9)$  мкмоль/мг протеїну по відношенню до контрольного зразку, який не містив субстрат (Рис. 3.7). Щоб показати, чи дійсно NO є продуктом розкладання SC мікросомною фракцією печінки, в інкубаційне середовище додавали пастку NO, комплекс  $DDC-Fe^{+2}$  [109, 113] (Рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Утворення нітриту під час метаболічного перетворення 7,5 мМ семікарбазиду мікросомами печінки щурів протягом 15 хвилин (\* $P < 0,05$  відносно Контролю (без SC), \*\* $P < 0,05$  щодо SC) [109].

Кількість утвореного за даних умов аміаку складала 200 мкмоль/мг протеїну, що було в 2 рази вище ніж у контролі (Рис. 3.8) та на порядок перевищувало концентрації двох інших продуктів реакції, що з нашої точки зору поки не зрозуміло, але можливо пов'язано з різним рівнем чутливості застосованих методів детектування [109].



**Рис. 3.8.** Утворення амонію під час метаболізації 7,5 мМ семікарбазиду мікросомами печінки щурів протягом 15 хвилин (\* $P < 0,05$  відносно Контролю) [109].

Таким чином, біотрансформація SC відбувається за участі цитохромів P-450 з утворенням трьох продуктів: формальдегіду, оксиду азоту та амонію.

FA є високо реактивною сполукою, що здатна утворювати основи Шиффа з вільними аміно- і амідогрупами протеїнів з подальшим формуванням метиленових містків, що сприяє розгортанню протеїнів та призводить до багатьох патологічних станів. За даними клінічних досліджень летальна доза FA в крові становить близько 0,08% (~27 ммоль/л) [109, 167]. У випадку, коли порушення в печінці не настільки значні і можуть бути оборотними після гострих токсичних впливів, існує ймовірність того, що за повторних дій, навіть в концентраціях нижчих, ніж клінічна доза, ці деструктивні зміни можуть бути більш серйозними. Такі ефекти залежно від способу їх реалізації можуть впливати або безпосередньо на гепатоцити, або опосередковано через систему кровообігу на імунну систему [109, 168].

Як докладно було описано у пп. 1.3 та 3.2, токсичність NO за умов його надмірного генерування відповідними системами організму зумовлена здатністю атакувати залізо-сірчані кластери протеїнів, насамперед ензимів, з формуванням ДНКЗ, залученням до регулювання процесів ПОЛ, впливом на синтез протеїнів та ДНК, що може призводити до зниження життєздатності та апоптозу клітин [169].

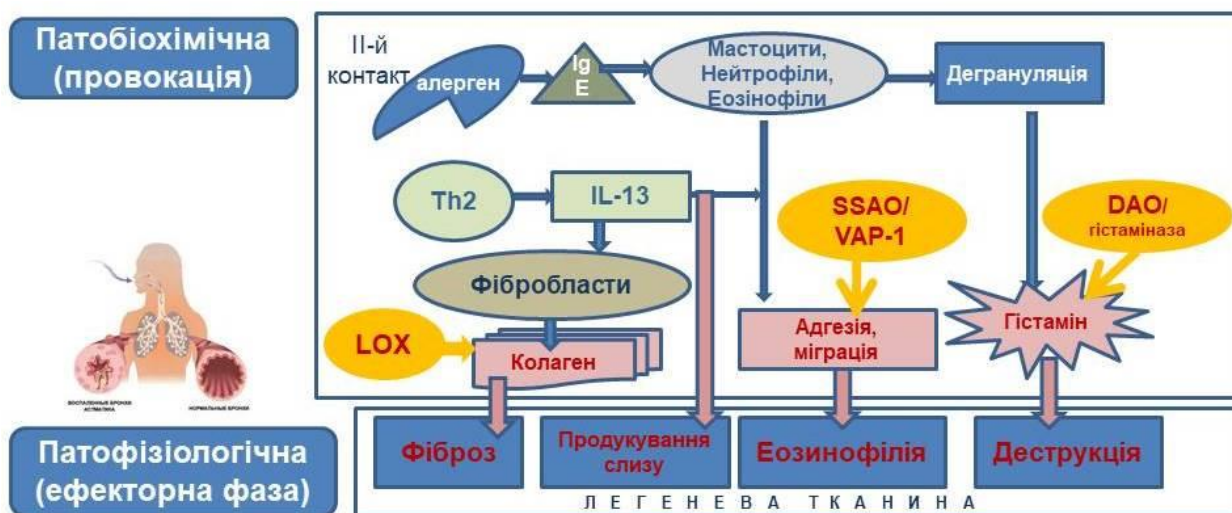
Аміак є так само високо токсичною для організму сполукою. Його концентрація в крові в нормі не перевищує 50 мкмоль/л. Зростання цього показника до 100 мкмоль/л може викликати порушення свідомості, а концентрація в 200 мкмоль/л викликає кому і конвульсії [109, 170].

### **Висновок №3.**

Показано, що розкладання семікарбазиду відбувається за участі CYP450 печінки щурів з продукуванням FA, NO та аміаку. Концентрація SC до 1,5 mM не призводила до формування активного інтермедіату каталітичного циклу CYP450 з подальшим утворенням продуктів реакції.

### 3.4 Залучення мідь-вмісних амінооксидаз до розвитку патологічних змін за умов овальбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків

За результатами проведених досліджень *in vivo* (див. п.3.1 та 3.2), які виявили позитивну кореляцію між рівнями активностей АОаз та ступенем розвитку захворювань нирки, ми зробили припущення, що ці ензими залучені до деструктивних змін не тільки в нирці, але й також в тканинах органів-мішеней за інших патологій. З метою перевірки такого припущення нами було обрано модель OVA-індукованої бронхіальної астми у мурчаків, яка супроводжується, гіперактивністю дихальних шляхів, продукуванням слизу, зміною морфології гладеньких м'язів дихальних шляхів, інфільтуванням імунних клітин в зону запалення та вивільненням надмірних кількостей гістаміну з дегранульованих мастоцитів в легеневу тканину, а також субепітеліальним фіброзом. Більшість з цих процесів знаходиться під контролем Cu-АОаз (Рис. 3.9), що робить їх невід'ємними учасниками патологічного процесу ремоделювання дихальних шляхів, головного прояву пізньої фази atopічної бронхіальної астми.



**Рис. 3.9.** Потенційне залучення мідь-вмісних амінооксидаз до ремоделювання дихальних шляхів на пізній (ефекторній) фазі atopічної бронхіальної астми [71].

Для підтвердження участі Cu-AOаз (SSAO, DAO та LOX) у патогенезі обраного захворювання та як можливий корегувальний засіб було використано SC в концентрації, підібраній з врахуванням попередніх результатів дослідів *in vivo* та *in vitro* [164]. За atopічної бронхіальної астми, патології яка супроводжується запаленням та ремоделюванням дихальних шляхів, багаторазово зростають рівні Cu-AOаз (SSAO, DAO та LOX) в тканинах тварин. Тому для ефективного їх пригнічення застосовували SC наступним чином. Тварини отримували 0,05% розчин SC 5 днів на тиждень з питвом та 0,2% розчин у вигляді інгаляцій тривалістю 5 хв 3 рази на тиждень починаючи з 1-го дня провокацій (див. п.2.2 «*Моделювання atopічної бронхіальної астми*»). Добова доза SC для тварин 1-ї групи та разова доза для тварин 2-ї групи становили ~ 10 мг/кг ваги. За нашими підрахунками така доза SC відповідала приблизно порогу чутливості монооксигензаної системи печінки щурів (CYP450), яку ми визначили в досліді *in vitro* (див. п.3.3), у випадку якщо цей показник екстраполювати на вагу тіла тварин.

Беручи до уваги, що NO є медіатором запалення та біорегулятором респіраторної функції, а також виявлену нами позитивну кореляцію між функціонуванням АОаз та обміном АФА за патологічних умов, на цій моделі було також досліджено показники рівня генерування NO в дихальних шляхах.

Таким чином, основним завданням етапу №4 досліджень було на моделі хронічної овальбумін(OVA)-індукованої бронхіальної астми у мурчаків дослідити причетність Cu-AOаз до патологічних змін в тканині легені як органу-мішені шляхом застосування SC, а також оцінити особливості змін показників оксидативно/нітрозативного стресу.

**– Маркери реакції гіперчутливості I типу та оксидативно/нітрозативного стресу у мурчаків за умов овальбумін-індукованої бронхіальної астми**

Задля характеристики розвитку реакції гіперчутливості I типу (алергічного запалення), опосередкованої зсувом імунної відповіді в бік Th2-

ланки, досліджували вміст ІЛ-4 та ІЛ-13 в плазмі крові та легеневій тканині, відповідно. Вибір цих маркерів та тканин для їх визначення було зроблено на основі даних, описаних в літературі (див. п 1.3. «Характеристика патогенезу бронхіальної астми та фіброзу легені»). Оскільки на початковій стадії розвитку реакції організму на сенсibilізацію алергеном регулювання більшості процесів відбувається за участі ІЛ-4, тобто гуморальної ланки імунітету, то визначення цього показника здійснювали в плазмі крові піддослідних тварин. Аналіз рівня ІЛ-13 здійснювали в легеневій тканині мурчаків, оскільки на пізній (ефекторній) фазі захворювання мають місце деструктивні зміни в легеневій тканині внаслідок інфільтрування медіаторів запалення та імунних клітин в легені. Результати проведених досліджень приведено у табл. 3.11. Як видно з даних таблиці, достовірних змін рівня ІЛ-4 в плазмі крові тварин з OVA-індукованою астмою відносно контролю не спостерігається. Цей факт є цілком зрозумілим, оскільки пік синтезу цього прозапального цитокіну має місце на більш ранніх стадіях захворювання. Потрібно також зауважити, що в плазмі крові мурчаків, яких тільки сенсibilізували та тих, що провокували без попередньої сенсibilізації, цей показник був на тому ж рівні як і у астматичних тварин. Дослідження ІЛ-13 в тканині легені виявило підвищення його рівня у 2 рази в групі астматичних тварин порівняно з контрольною групою (Табл. 3.11). Водночас, цей показник був на тому ж рівні, що і у тварин сенсibilізованих але не провокованих алергеном. Тобто, дані оцінки рівня обох проатопічних інтерлейкінів, які виробляють Th2-клітини, свідчить про розвиток реакції гіперчутливості I типу лише за умов вторинного контакту з алергеном сенсibilізованого організму. Виявлене співвідношення концентрації визначених запальних цитокінів (зсув у бік ІЛ-13) відповідає даним літератури, оскільки на пізній стадії розвитку хронічної atopічної астми ІЛ-13 належить більш важлива роль і його рівень має перевищувати рівень ІЛ-4 [71].

**Таблиця. 3.11.** Рівні прозапальних цитокінів ІЛ-4 та ІЛ-13 в крові та легені мурчаків за умов бронхіальної астми та за умов корегування її семікарбазидом ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ ) [71]

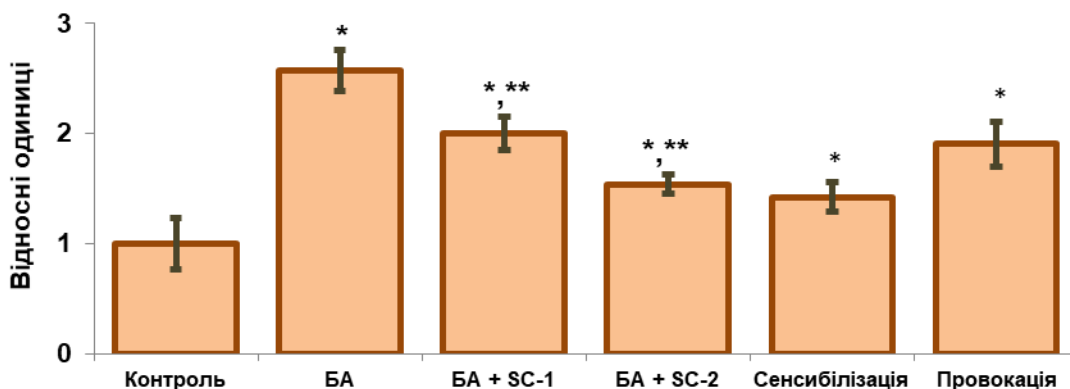
Стан	ІЛ-4 плазми, пг/мл плазми	ІЛ-13 легені, УО/мкг протеїну
Контроль	7,73±0,79	18,2±3,9
Бронхіальна астма (БА)	11,0±2,2	36,9±10,0*
БА + SC-1	8,65±1,7	25,6±5,5*
БА + SC-2	10,0±1,78	29,6±14,6*
Сенсибілізація	8,7±1,4	30,6±2,6*
Провокація	9,81±19	28,1±14,1

\* $P < 0,05$  відносно Контролю

У астматичних тварин обох груп, які одержували семікарбазид, рівень обох проалергічних цитокінів ІЛ-4 в крові та ІЛ-13 в легені не зазнавав змін (Табл. 3.11). Тобто, семікарбазид не впливав на цю ланку імунної відповіді організму тварин.

В легені, як найбільш оксигенованому органі, за умов прогресії патологічного стану досить швидко інтенсифікуються окисні процеси, що призводить до розвитку оксидативного стресу. Оксидативний стрес в легеневій тканині експериментальних тварин характеризували за вмістом вільних радикалів, який визначали методом ЕПР. Як вже зазначалось в підрозділі 3.2 п., сигнал ЕПР с  $g=2,00$  в зразках тканин дають вільні радикали, які генеруються убіхіноновими та семіхіноновими ділянками ЕТЛ, і його потужність на кілька порядків перевищує ті, що пов'язані з окисними процесами [156]. Так, цей показник у в легеневій тканині мурчаків-астматиків був збільшений у 2,6 разів у порівнянні з контрольної групою (Рис. 3.10), що свідчить про інтенсифікацію процесів на відповідних ділянках ЕТЛ клітин легеневої тканини, і як наслідок, ушкодження клітинних структур. Споживання семікарбазиду обома групами тварин-астматиків достовірно знижувало в їх легеневій тканині вміст вільних радикалів на 20% та 30%

відповідно в групах БА+SC1 та БА+SC2 у порівнянні з нелікованими тваринами (група «БА») (Рис.3.10).



**Рис. 3.10.** Вміст вільних радикалів в легеневій тканині мурчаків за умов бронхіальної астми та за умов корегування її семікарбазидом ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ ). \* $P < 0,05$  відносно контролю; \*\* $P < 0,05$  відносно БА [71].

Оскільки оксид азоту відіграє важливу роль у регулюванні функціональної активності дихальної системи та є загальноприйнятим маркером загострення бронхіальної астми, було визначено низку показників, що характеризують стан нітрозативної системи організму піддослідних тварин. Аналіз отриманих даних продемонстрував, що у мурчаків з БА кількість протеїну iNOS в легеневій тканині зростала в 2,2 рази відносно групи інтактних тварин (Табл. 3.12). В обох групах тварин негативного контролю цей показник був на тому ж рівні, що і у мурчаків-астматиків, що свідчить про активацію системи синтезу NO у відповідь на контакт з алергеном незалежно від способу, яким це відбулось [71].

Визначення відсотку клітин БАЛ, які генерують NO, показало, що їх кількість в групі тварин з бронхіальною астмою зростала більше ніж у 2 рази порівняно з контролем (Табл. 3.12). При аналізі цього показника у тварин обох груп негативного контролю виявилось, що він має ті ж значення що і у тварин з бронхіальною астмою. При цьому кількість протеїну iNOS в легені і кількість генерованого NO в рідині БАЛ обох груп тварин, у яких розвивалась бронхіальна тастма на тлі прийому семікарбазиду(БА + SC-1та БА + SC-2), відносно групи БА також не змінювались (Табл. 3.12). Таким



чином, семікарбазид не виявив ефекту не тільки на розвиток алергічної реакції, а й на функціонування системи синтезу NO в тканинах астматичних тварин [71].

**Таблиця 3.12.** Показники системи синтезу NO у мурчаків з бронхіальною астмою та за умов корегування її семікарбазидом ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ ) [71].

СТАН	Індуцибельна NO-синтаза легені, УО/мкг протеїну	Клітини БАЛ, що генерують NO, %
Контроль	0,075±0,02	16,5±0,98
Бронхіальна астма (БА)	0,168±0,03*	35,1±9,9*
БА + SC-1	0,136±0,04*	29,0±7,8*
БА + SC-2	0,207±0,02*	40,2±17,5*
Сенсибілізація	0,168±0,05*	28,1±4,1*
Провокація	0,158±0,05*	34,1±5,5*

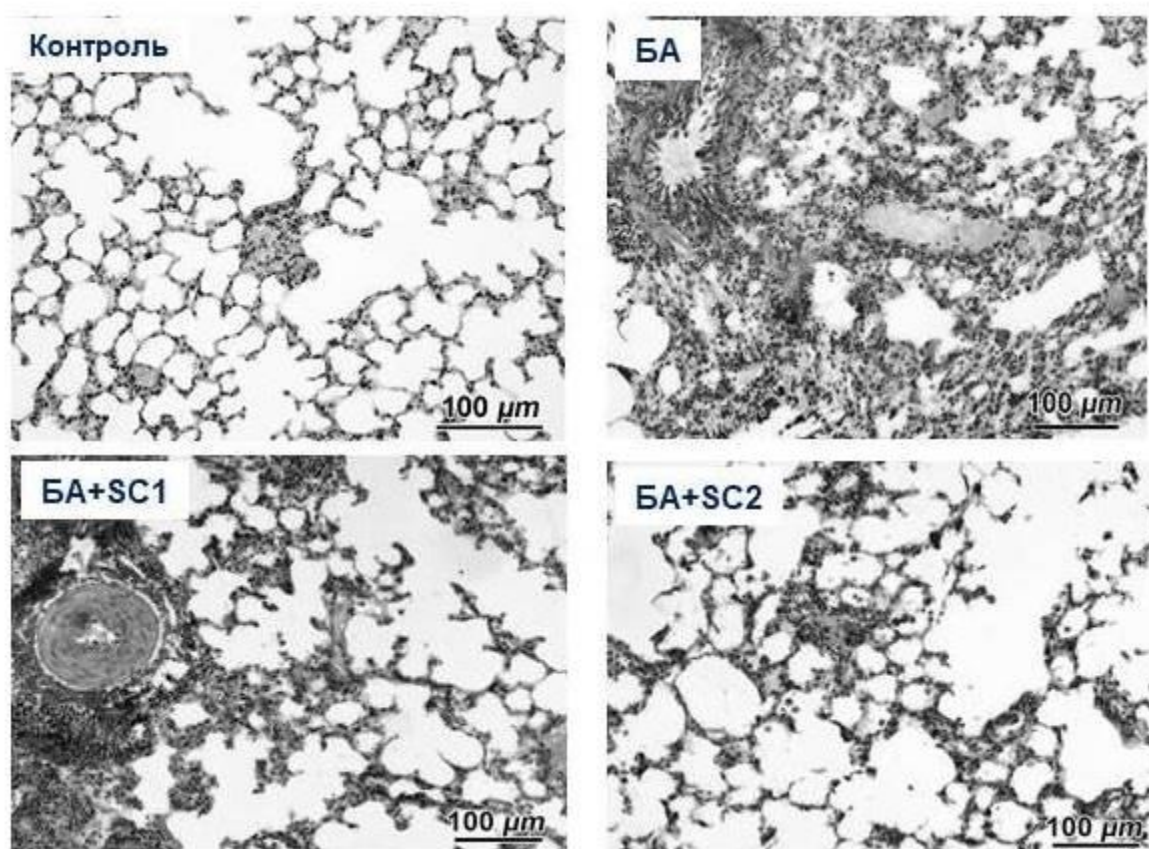
\* $P < 0,05$  відносно Контролю

– *Гістологічні та морфометричні дослідження тканини легені у мурчаків за умов овальбумін-індукованої бронхіальної астми*

Гістологічне дослідження зразків легені інтактних мурчаків продемонструвало нормальну архітекtonіку респіраторного відділу, тоді як у тварин з розвинутою БА спостерігалось потовщення стінок альвеол, що розвивалось в периферичних ділянках легені на тлі перибронхіального запального інфільтрату, в складі якого переважали еозинофіли та нейтрофіли. При цьому спостерігались обструкція бронхів середнього та дрібного калібру внаслідок гіперплазії бронхіального епітелію, а також ознаки патологічного процесу заміщення легеневої тканини сполучною, відомі як пневмосклероз (Рис. 3.11) [71].

На рис. 2.2 (див. розділ 2, п. 2.9 Гістологічні та морфометричні дослідження) наведено схематичне зображення респіраторних бронхіол та морфометричні показники, за якими було здійснено аналіз змін конфігурації цього відділу легені експериментальних тварин: ширина входу в альвеолу (а); глибина альвеоли (b); ширина альвеолярного ходу (c). В групі БА

спостерігались суттєві зміни конфігурації респіраторних бронхіол відносно контролю, про що свідчило значне підвищення  $\text{Coef.1 (a/b)}$  порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ) (Рис. 3.12 А), а також тенденція до зростання  $\text{Coef.2 (c/2b)}$  (Рис. 3.12 Б).

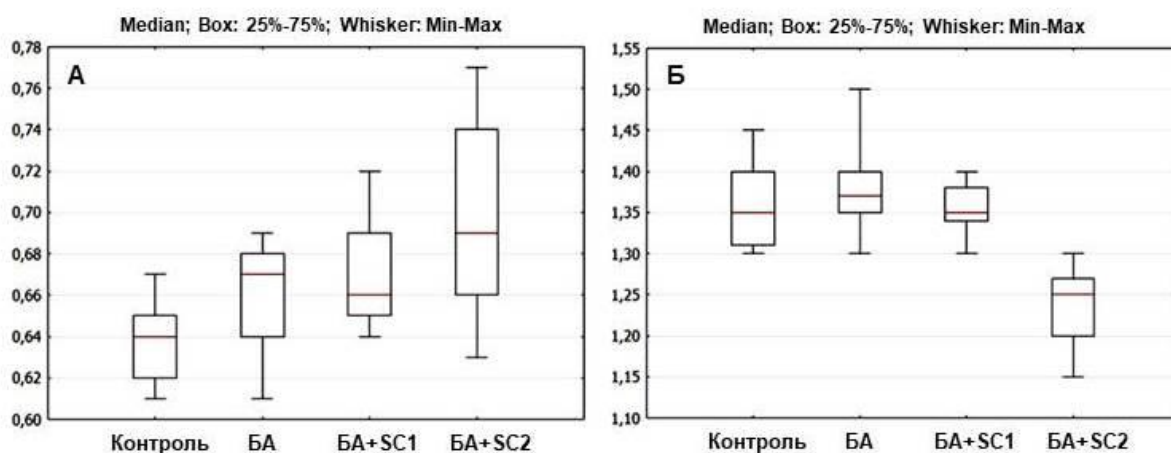


**Рис. 3.11.** Типові мікроскопічні фотографії зразків легені інтактних та астматичних мурчаків (100-кратне початкове збільшення), пофарбованих Н&Е (поперечні зрізи) [71].

Водночас, в легені тварин груп БА+SC1 та БА+SC2 спостерігались менш виражені ознаки патології, такі як обструкція просвіту бронхів на тлі перибронхіального запального інфільтрату та склерозу, в порівнянні з групою БА (Рис. 3.11). Як видно з результатів, представлених на рис. 3.12, значне зниження  $\text{Coef 1}$  у групі БА+SC1 порівняно з БА ( $p < 0,05$ ) (Рис. 3.10А) та  $\text{Coef 2}$  у групі БА+SC2 порівняно з БА ( $p < 0,05$ ) (Рис. 3.12Б) свідчить про менш виражений розвиток у них пневмосклерозу.

Зміни конфігурації респіраторних бронхіол у тварин групи БА+ SC2 були зумовлені, з одного боку, збільшенням ширини входу в альвеолу, а з

іншого – зменшенням ширини альвеолярного проходу, що призвело до істотних змін структурних проявів розвитку обструктивної емфіземи легені (Рис. 3.12 Б).



**Рис. 3.12.** Оцінка зміни конфігурації респіраторних бронхіол за морфометричними показниками Коef. 1(А) і Коef. 2 (Б) у інтактних та астматичних мурчаків ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ ) [71].

– *Дослідження рівнів активностей мідь-вмісних амінооксидаз в тканинх мурчаків за умов овалбумін-індукованої бронхіальної астми*

В тканинах експериментальних тварин з розвиненою патологією спостерігалось значне достовірне зростання рівнів активностей досліджуваних Cu-AOаз (Табл. 3.13).

Як ми і очікували, активність LOX в легені мурчаків з астмою зростала більше ніж у 2 рази відносно контрольної групи (Табл. 3.13). Як вже зазначалось вище, епітелійні та ендотелійні клітини легені внаслідок IL-13-регульованого епітелійно-мезенхімного переходу (ЕМП) на пізній фазі розвитку алергічної реакції набувають фенотипових властивостей мезенхімних клітин, міофібробластів та фібробластів. Фібробласти, що активно проліферують, секретують надлишкові кількості компонентів позаклітинного матриксу (ПКМ), колаген та еластин, інтенсивне зшивання яких за участі LOX призводить до зниження розчинності цих протеїнів ПКМ

і, як наслідок, посилення його жорсткості та пневмосклерозу легеневої тканини [71].

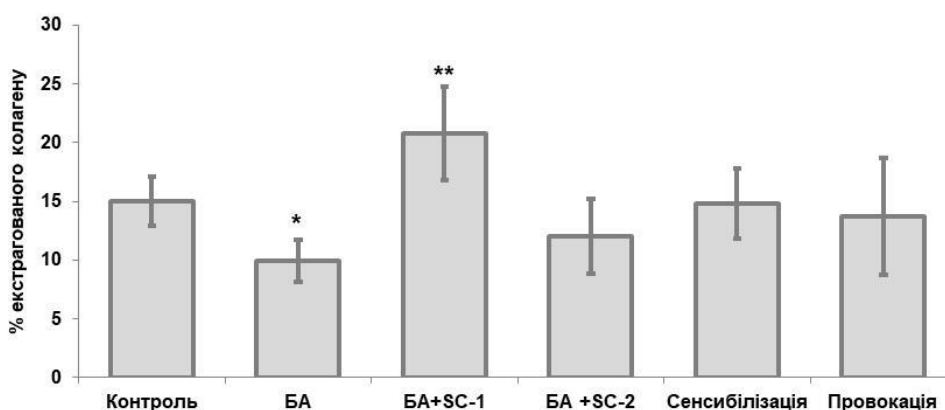
**Таблиця 3.13.** Активність амінооксидаз тканин мурчаків з бронхіальною астмою та за умов корегування її семікарбазидом ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ ) [71].

СТАН	LOX легені мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг	SSAO плазми, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг	DAO плазми, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг	DAO БАЛ, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг
Контроль	0,22±0,03	0,18±0,04	0,16±0,05	9,35±1,91
БА	0,42±0,07 <sup>*</sup>	0,27±0,05 <sup>*</sup>	0,31±0,03 <sup>*</sup>	2,45±0,47 <sup>*</sup>
БА + SC1	0,31±0,03 <sup>*,**</sup>	0,17±0,03 <sup>**</sup>	0,11±0,02 <sup>**</sup>	3,13±0,91 <sup>*</sup>
БА + SC-2	0,29±0,02 <sup>*,**</sup>	0,15±0,03 <sup>**</sup>	0,12±0,04 <sup>**</sup>	2,18±1,61 <sup>*</sup>
Сенсибілізація	0,27±0,03	0,19±0,04	0,17±0,03	5,84±0,86
Провокація	0,36±0,06 <sup>*</sup>	0,14±0,04	0,39±0,10 <sup>*</sup>	6,93±1,67

<sup>\*</sup>P<0,05 відносно Контролю, <sup>\*\*</sup>P<0,05 відносно БА

Таким чином, підвищений рівень активності LOX в легені є однією з причин та маркером фіброзних змін легеневої тканини за умов бронхіальної астми [71, 171]. Зростання рівня активності LOX відмічене також лише в одній з двох груп негативного контролю, а саме у тварин провокованих OVA без попередньої сенсибілізації. Як ми і очікували, споживання SC тваринами з індукованою БА (БА+SC-1 та БА+SC-2) призводило до достовірного зниження рівня активності LOX в легені відносно групи БА майже до значення цього показника в контролі (Табл. 3.13). У провокованих алергеном тварин активність LOX в легеневій тканині збільшувалась майже в тому ж ступені, що і у астматичних мурчаків, що може бути пов'язано лише з надлишковою продукцією колагену активованими фібробластами. Таким чином, LOX безпосередньо причетна до процесу фіброзу, ознаки якого в обох групах астматиків, що вживали семікарбазид, зменшувались [71].

На жаль, в легеневій тканині експериментальних тварин змін розчинності колагену дослідити можливості не було у зв'язку з недостатньою кількістю тканини для проведення оцінки цього показника. Проте, нам вдалось виявити суттєве, 1,5-кратне, зниження розчинності колагену в шкірі астматичних мурчаків відносно контролю (Рис. 3.13). З огляду на те, що бронхіальна астма є системним та хронічним захворюванням, то вірогідність процесів надмірного депонування і зшивання колагену в шкірі мурчаків за умов моделювання OVA-індукованої БА є досить високою і, безумовно, має позитивно корелювати з цими процесами в інших тканинах, насамперед, в легені. При цьому, в обох групах негативного контролю достовірних змін цього показника не спостерігалось. Відновлення ступеня розчинності колагену в шкірі виявлено лише у тих тварин, що споживали SC з питвом, БА + SC1 (Рис.3.11), тобто довготривала експозиція організму тварини до дії SC, в яких розвивалась астматична патологія, призводила до пригнічення гіперактивування LOX і в інших тканинах, окрім органу-мішені.



**Рис. 3.13.** Ступінь розчинності колагену шкіри експериментальних тварин за умов моделювання OVA-індукованої БА та її корегування семікарбазидом ( $M \pm m$ ,  $n=3-5$ , \* $P < 0,05$  відносно контролю, \*\* $P < 0,05$  відносно БА).

В плазмі крові астматичних тварин було детектовано також збільшення в 1,5 рази рівня активності SSAO в порівнянні з контролем. Цей показник вважається маркером патологічного стану, оскільки розчинна форма ензиму присутня в крові внаслідок розщеплення його мембранозв'язаної форми в

ендотелійних клітинах [36]. Ми припускаємо, що джерелом плазматичної форми SSAO хворого організму може бути тканина органів-мішеней досліджуваної патології, оскільки саме вона зазнає найбільшого впливу деструктивних чинників імунної відповіді. Відомо, що в плазмі крові та в змивах з епітелійного шару бронхів у астматиків на стадії загострення хвороби концентрації серотоніну та катехоламінів (дофаміну, норадреналіну та адреналіну), які є попередниками субстратів SSAO, перевищують фізіологічний рівень на декілька порядків. Таким чином, підвищення активності цього ензиму в плазмі крові астматичних тварин пов'язано з руйнівною дією надлишкових рівнів продуктів окисного дезамінування прозапальних медіаторів у високоваскуляризованій легеневої тканині. У тварин обох груп негативного контролю змін активності SSAO відносно контролю не спостерігалось, тобто, активність ензиму змінювалась тільки за умов розвитку ознак астми. З іншого боку, SSAO/VAP-1 також безпосередньо залучена до запальних процесів в органах-мішенях, оскільки в досліджах *in vivo* на тваринних моделях нейтрофільних легеневих захворювань було доведено, що даний ензим сприяє міграції нейтрофілів під час гострого запалення легені, легеневої інфекції та гіперпластичності дихальних шляхів [71, 172].

Концентрація прозапального медіатора, гістаміну в організмі регулюється, як вже зазначалось, DAO/гістаміназою, а рівень активності цього ензиму в плазмі крові хворих на бронхіальну астму вважається маркером загострення патології [1, 71]. Більш того, як вже згадувалось, внаслідок зниженої експресії DAO може розвиватись непереносимість до гістаміну, що в надлишку потрапляє з продуктами харчування. Вважається, що зазначений феномен може бути однією з можливих причин алергічних реакцій [2, 72]. Беручи до уваги відсутність в літературі інформації про особливості функціонування DAO в легені, як органі-мішені бронхіальної астми, нами були проведені наступні експерименти з метою з'ясування цього питання.

Як і очікувалось, в плазмі астматичних мурчаків встановлено достовірне зростання рівня активності DAO/гістамінази у 2 рази відносно контролю (Табл. 3.13), що відповідає підвищеним концентраціям гістаміну в крові за даної патології. Натомість, активність ензиму не зазнавала змін у відповідь на сенсibilізацію, тоді як OVA-провокації викликали достовірне підвищення цієї активності у 2,5 рази в порівнянні з цим показником у інтактних тварин. Отримані дані дозволили зробити висновок, що на активність ензиму впливає саме контакт дихальних шляхів з алергеном. Таким чином, підвищені рівні SSAO та DAO в плазмі мурчаків з астмою додатково підтверджували розвиток оксидативного/карбонільного стресу за умов патологічного стану організму тварин [71].

В групах мурчаків, які споживали SC під час розвитку в їх організмі реакції гіперчутливості I типу, БА+SC-1 та БА+SC-2, стримувалось підвищення рівнів активностей SSAO та DAO в плазмі (Табл. 3.13), яке спостерігалось у тварин групи «БА». Ні сенсibilізація, ні провокація окремо не впливали на активність SSAO в плазмі відносно контрольної групи мурчаків. Це може свідчити про те, що нижчий рівень активності цього ензиму в крові астматичних тварин, що отримували семікарбазид, відносно групи «БА» пов'язаний із відповідно нижчим вмістом у цій тканині кількості попередників субстратів SSAO (маркерів загострення запального процесу), а також з менш інтенсивними руйнівними процесами в легеневій тканині, про що свідчать дані гістологічних та морфометричних досліджень в цих групах тварин (Рис. 3.11 та 3.12).

Враховуючи те, що у провокованих алергеном тварин активність DAO в плазмі крові зростала в тому ж ступені, як і у астматиків (Табл. 3.12), ймовірно завдяки викиде базофілами медіаторів запалення гістаміну у кров, можна вважати, що нормальний рівень цього показника у астматичних тварин обох груп, які отримували семікарбазид, пов'язаний із відсутністю надлишкової кількості гістаміну в крові.

Зовсім інша картина спостерігалась щодо активності DAO в рідині БАЛ у тварин з астмою. Цей показник достовірно знижувався у 4 рази відносно групи інтактних тварин (Табл. 3.13), тоді як за даними літератури відомо про значне (10-кратне) зростання рівня гістаміну в рідині БАЛ за даного патологічного стану в порівнянні із нормою [71, 173]. Таку невідповідність рівня активності ензиму і концентрації його субстрату у дихальних шляхах можна пояснити тим, що гістаміназа в цьому відділі дихальних шляхів не активується у відповідь на ендогенне вивільнення гістаміну, і, навпаки, можливо знижена її експресія у відповідь на дію алергену [71, 173]. Скоріш за все, такий низький рівень активності DAO і, як наслідок, присутність надмірної кількості гістаміну в епітелії дихальних шляхів астматичних тварин, може бути основною причиною бронхоспазматичної активності за даної патології. На користь цього свідчать дані групи дослідників, які продемонстрували досить ефективне використання DAO/гістамінази рослинного походження (очищеної з паростків гороху та кон'югованої з поліетиленгліколем для зниження імуногенності) для пригнічення проявів бронхіальної астми у мурчаків. Тільки введення мурчакам-астматикам цього протеїну, внутрішньочеревно та інгаляційно як у вільній, так і в імобілізованій формі, знижувало прояви гіперчутливості та фіброзу дихальних шляхів, про що свідчили гістологічні дослідження і дані про відновлення дихальної функції [71, 173]. За умов як сенсibilізації без провокації, так і провокації без сенсibilізації спостерігалось також зниження рівня активності ензиму. Тобто, контакт організму з алергеном будь-яким чином, викликає специфічне пригнічення рівня активності цього ензиму в епітелії дихальних шляхів.

При цьому споживання семікарбазиду обома групами астматичних мурчаків не впливало на рівень активності DAO в змивах з епітелію бронхів цих тварин. Цей показник залишався на тому ж рівні, що і в групі БА (Табл. 3.13), що цілком зрозуміло, оскільки за умов розвитку астми відбувалось зниження активності гістамінази в епітелії дихальних шляхів до критично



низького рівня. Можливо цей феномен є ключовим ланцюгом біохімічних подій, які призводять до розвитку патофізіологічних ознак досліджуваного захворювання (кашель, задишка, важке дихання, хрипи тощо).

З огляду на різноскеровані та органоспецифічні зміни за умов бронхіальної астми рівнів активності АОаз, що вивчались, та вплив інгібітора цих ензимів на прояви захворювання, можна припустити, що Cu-АОази причетні до негативних впливів в організмі взагалі, та в органі-мішені, зокрема. Треба зауважити, що роль окремих амінооксидаз в цих процесах є діаметрально протилежною. Зокрема, розвиток гіперчутливості та субепітеліальний фіброз дихальних шляхів за бронхіальної астми супроводжується підвищенням рівня активності SSAO в плазмі та LOX у легеневій тканині на тлі суттєвого зниження активності DAO в епітелії бронхів.

Відомо, що аналіз периферійної крові не є специфічним і не відповідає змінам у легені хворих на астму [71, 174]. Аналіз визначених нами показників в крові, легені та рідині БАЛ астматичних тварин підтверджує цей факт та наше припущення про причетність АОаз, які катаболізують біогенні аміни, зокрема DAO, що каталізує окисне дезамінування прозапального агенту гістаміну, та залучені до посттрансляційних модифікацій колагену та еластину (LOX), до патологічних змін у органі-мішені, тоді як показники рівнів активності SSAO та DAO в плазмі відповідають рівню загального запального процесу в організмі.

#### **Висновок №4**

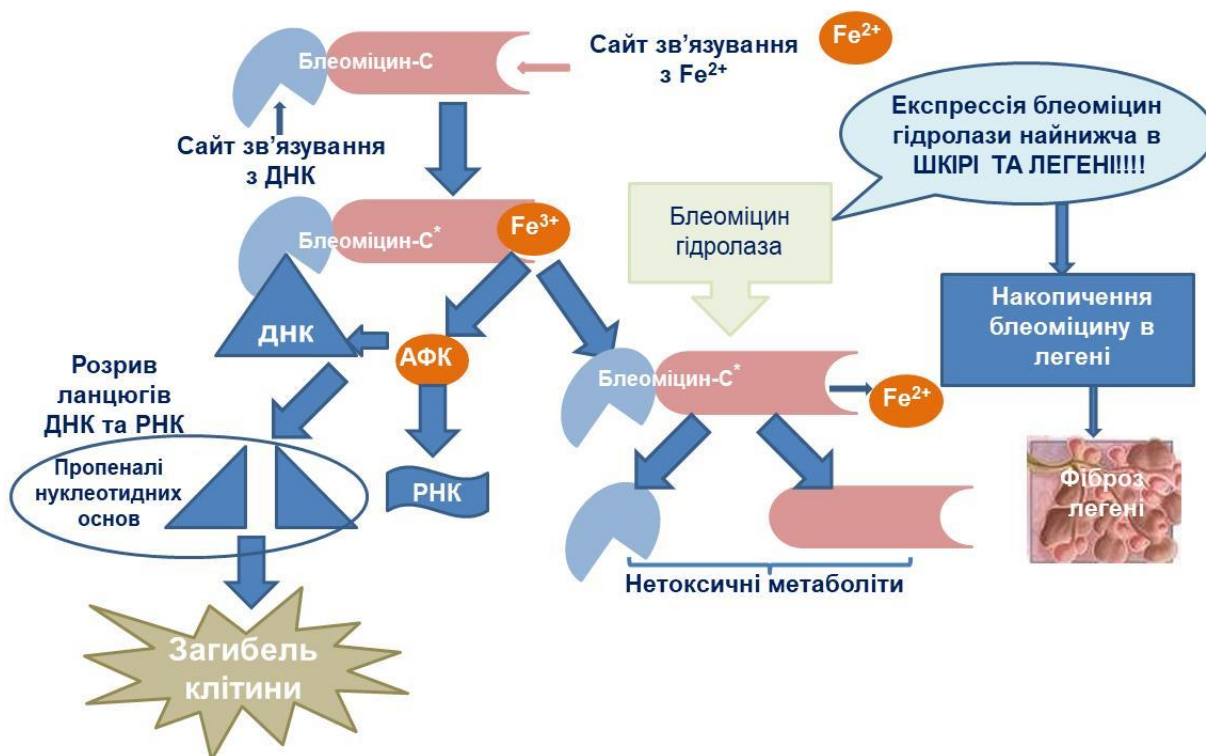
Продемонстровано, що ремоделювання дихальних шляхів за овальбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків супроводжується багаторазовим підвищенням в легеневій тканині та крові тварин рівнів активностей Cu-АОаз, SSAO, DAO, LOX. Споживання 0,05% семікарбазиду тваринами з бронхіальною астмою призводило до зменшення прояву ознак патології за рахунок інгібування досліджуваних ензимів.

### 3.5. Ослаблення семікарбазидом ознак блеоміцин-індукованого фіброзу легені у щурів.

Отримані на попередньому етапі роботи дані щодо участі АОаз у розвитку хронічної бронхіальної астми показали причетність LOX до морфологічних змін в органі-мішені, а саме розвитку фіброзу легені, одного з симптомів цього складного системного захворювання. Тому наступним було поставлено завдання №5: вивчити механізми залучення АОаз (LOX, SSAO, DAO, PAO) до патогенезу ще однієї легеневої патології, пульмонологічного фіброзу, шляхом застосування, як і на попередньому етапі, їх інгібітора семікарбазиду.

Патологію індукували шляхом введення експериментальним тваринам протипухлинного антибіотика «Блеоміцину С», отриманого з продуценту *Streptomyces verticillus*. Молекулярний механізм, що реалізує індукування цим препаратом легеневого фіброзу, заслуговує уваги, оскільки проливає світло на можливу участь АОаз у прогресуванні цього захворювання (Рис. 3.14). Блеоміцин С здатен утворювати комплекси з металами перехідної валентності, насамперед Fe(II), які за присутності молекулярного кисню виявляють високу ензимоподібну дію на молекули ДНК, що призводить до їх одно- та дволанцюгових розривів. Продукти деградації ДНК за присутності АФК утворюють високореактивні сполуки альдегідної природи, пропеналі вільних нуклеотидних основ (base propenals), які виявляють високу цитотоксичність, що перевищує у 30-50 разів дію малонового диальдегіду [175]. Ці сполуки інгібують синтез ДНК та інших макромолекул, а також ініціюють перекисне окислення ліпідів з подальшою агрегацією протеїнів. В клітинах присутній ензим цистеїнова пептидаза, блеоміцингідролаза, що забезпечує захист від цитотоксичної дії блеоміцину [176]. Проте, цей ензим повністю відсутній у легені та шкірі, в результаті чого відбувається накопичення токсичних продуктів деградації ДНК в цих органах з наступною індукуванням патологічних процесів, насамперед фіброзу [177]. Саме тому блеоміцин переважно використовується для моделювання фіброзу легені на

тваринах. На ранніх стадіях блеоміцин-індукованого ушкодження легені тварин мають місце ураження пов'язані з біохімічними та функціональними змінами, які спостерігаються за легеневого фіброзу людини, а саме: активування, міграція та інфільтрування запальних клітин, проліферування, міграція та активування фіброblastів/міофіброblastів, міграція та проліферування епітелійних клітин, підвищений вміст колагену, зниження об'єму легень та їх уразливість [178]. З огляду на вищесказане, головною рушійною силою цієї легеневої патології, з усіма переліченими проявами захворювання, є оксидативно/карбонільний стрес, внесок до якого за патологічних станів організму роблять АОази. Таким чином, АОази безумовно можуть бути залучені до патогенезу фіброзу легені, а застосування SC на цій експериментальній моделі допоможе остаточно довести наше припущення.



**Рис. 3.14.** Механізм фармакологічної дії та легеневої токсичності Блеоміцину-С.

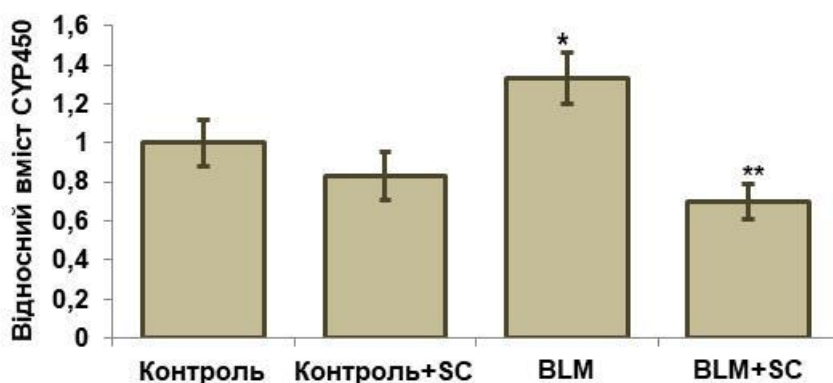
Введення SC тваринам здійснювали *per os*, оскільки саме такий спосіб на попередньому етапі виявив найбільший ефект. Концентрацію SC при цьому в порівнянні з моделлю OVA-індукованої БА було знижено у 10 разів,

керуючись наступними міркуваннями. За нашими підрахунками, доза, яку отримували мурчаки-астматики,  $\sim 10$  мг/кг ваги, була на межі порогу чутливості монооксигензаної системи печінки щурів (CYP450) до SC (див. п. 3.3), проте вона виявилась достатньо ефективною щодо корегувального впливу на прояви патології. Таким чином, необхідно було зменшити можливість токсичного впливу SC на організм експериментальних тварин, знизивши його концентрацію, та перевірити наявність відповідного ефекту щодо рівнів активностей досліджуваних ензимів та окисно-відновного стану організму. При цьому, добова доза SC за моделі BLM-індукованого фіброзу легені становила  $\sim 1,0$  мг/кг ваги щурів. В цьому досліді була також сформована група негативного контролю, а саме, інтактні щури, які споживали SC в обраній концентрації одночасно з тваринами з індукованим легеневим фіброзом, Контроль+SC.

На рис. 3.15 представлено дані ЕПР-аналізу зразків печінки піддослідних тварин щодо загального вмісту CYP450. З рисунку видно, що на 21-й день після індукування легеневого фіброзу у щурів введенням BLM в групі негативного контролю (Контроль+SC) цей показник не зазнавав достовірних змін відносно групи інтактних тварин. Водночас у тварин з фіброзом легені (BLM), цей показник був підвищений на 30% в порівнянні з контролем, тоді як в групі «BLM+SC» загальний вміст CYP450 був майже у 2 рази нижчий ніж в групі тварин «BLM».

Отримані результати свідчать про наступне. По-перше, за 21 добу споживання 0,005% SC не призводило до збільшення вмісту CYP450 в печінці інтактних тварин, що підтверджує безпечність цієї концентрації SC. По-друге, Блеоміцин С є, безумовно, токсичним для тварин, що досить докладно описано вище (Рис. 3.14). По-третє, SC нівелював цю токсичність Блеоміцину С, що є досить цікавим та несподіваним фактом. Виявлений феномен може реалізуватися за рахунок зниження рівня АФК, джерелом яких є також й АОази, з наступним пригніченням ензимоподібної дії блеоміцину та зниженням вмісту цитотоксичних продуктів деградації ДНК

(Рис. 3.14). В основі іншого пояснення може лежати безпосереднє зв'язування цих пропеналей семікарбазидом (Рис. 3.14), який є пасткою альдегідів, або зв'язування самого блеоміцину, що містить у складі молекули альдегідні групи. Внесок кожного з цих шляхів буде виявлено під час аналізу отриманих в цьому експерименті результатів.



**Рис. 3.15.** Загальний вміст цитохромів P-450 у печінці щурів інтактних та з BLM-індукованим легеневою фіброзом за умов споживання тваринами семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n=3-7$ ,  $*P < 0,05$  до Контролю,  $**P < 0,05$  до BLM) [107].

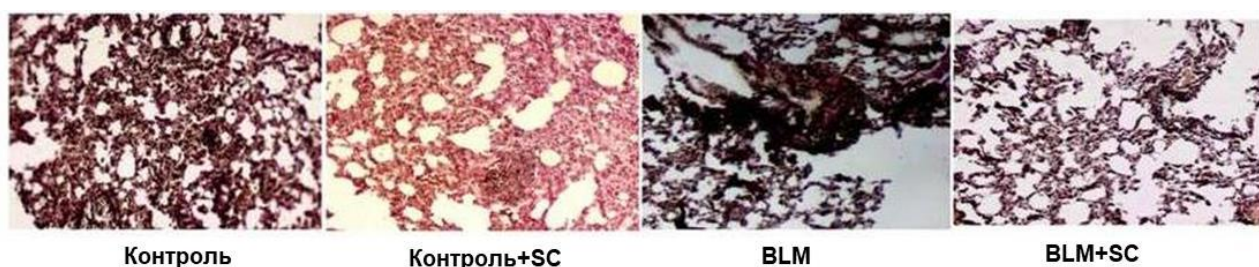
*– Гістологічні, морфометричні дослідження та ступінь вмісту/складу колагену легеневої тканини щурів за стану норми, BLM-індукованого фіброзу та його корекції семікарбазидом*

Оцінювання стану легеневої тканини експериментальних тварин здійснювали за допомогою гістологічного та морфометричного аналізів. Для цього проводили мікроскопічні спостереження, отримували зображення забарвлених зразків та проводили морфометричний аналіз легеневої тканини.

У тварин груп Контроль та Контроль+SC архітектура легеневої тканини виявилась нормальною: міжальвеолярні перетинки були тонкими, альвеоли, альвеолярні мішки виглядали чіткими та помітними, легеневі судини та розподіл фіброзної тканини відповідали рівню норми (Рис. 3.16).

Як видно з рис. 3.16, у всіх піддослідних тварин, яким вводили BLM, спостерігалися великі ділянки фіброзу з високою варіабельністю за ступенем

тяжкості патології у окремих тварин. Фіброзне ураження у тварин із розвинутою патологією характеризувалося потовщенням міжальвеолярних перетинок за рахунок акумулювання фіброblastів (утворення фіброblastичних вогнищ) і інфільтрування імунних клітин, частково збільшеними та розрідженими альвеолами, зменшенням відсотка повітряної площі альвеол, що також виявлялося у зменшенні ширини просвіту дихальних бронхіол, альвеолярних протоків та мішечків, що вказує на зниження газообмінної функції легені [107, 179]. Також, на зрізах легені від цих тварин виявлено інфільтрування поблизу кровоносних судин (Рис. 3.16).



**Рис.3.16.** Гістологічний аналіз забарвлених за Ван-Гізоном зрізів легеневої тканин щурів, інтактних та з BLM-індукованим фіброзом, за умов споживання тваринами семікарбазиду та без (200-кратне початкове збільшення) [107].

Натомість, на зрізах легені від тварин групи BLM+SC порівняно з групою BLM виявлено більш підвищену повітряність дихальних бронхіол, альвеолярних протоків і мішечків, менш виражене дифузне ураження альвеол, проте в окремих ділянках легеневої тканини виявлено вогнища інфільтрування різного розміру. Таким чином, тварини, які отримували SC після індукування фіброзу легені, мали менш виражені гістопатологічні ознаки гострого ураження тканини органу-мішені в порівнянні з тваринами групи BLM (Рис. 3.16).

Морфометричний аналіз оцифрованих зображень забарвлених гістологічних зразків виявив відсутність будь-яких морфологічних змін у легені тварин групи Контроль+SC порівняно з інтактними (Табл. 3.14).

Навпаки, зразки легеневої тканини щурів, яким вводили BLM, показали значні відхилення, пов'язані з розвитком фіброзу: значне зменшення середнього діаметра просвіту альвеол та глибини альвеол у 1,34 рази, ширини входу в альвеоли в 1,76 рази, а також площі поперечного перерізу альвеол у 2 рази порівняно з параметрами контрольної групи (Табл. 3.14). Кількісна морфометрична оцінка зразків легені щурів групи BLM+SC продемонструвала статистично значущі позитивні зміни порівняно з групою BLM: збільшення середнього діаметра просвіту альвеол, глибини та ширини входу в альвеоли до контрольних значень та подвоєння площі поперечного перерізу альвеол (Табл. 3.14).

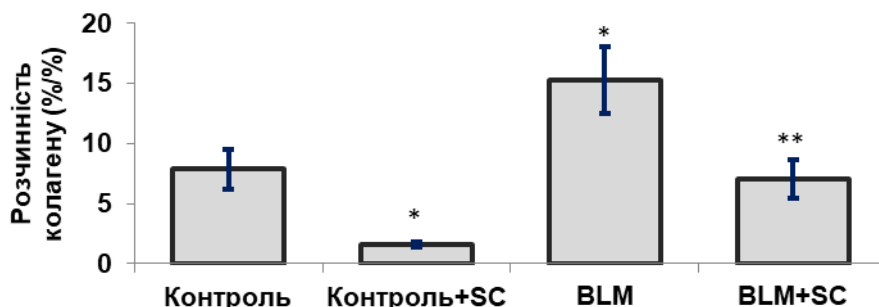
Таким чином, на 21-й день після введення щурам BLM гістологічні (Рис. 3.16) та комп'ютерні морфометричні дані (Табл. 3.14) підтверджують розвиток фіброзу у цих тварин. У той же час, 0,005% SC виявив антифіброзну та протизапальну дію.

**Таблиця. 3.14.** Морфометричний аналіз легеневої тканин щурів інтактних та з BLM-індукованим фіброзом за умов споживання тваринами семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n=3-7$ ) [107].

	Контроль	Контроль +SC	БЛМ	БЛМ+SC
Середній діаметр просвіту альвеоли, мкм	28,4±0,9	27,2±1,1	21,2±0,8	24,8±0,9
Глибина альвеоли, мкм	25,5±1,3	24,8±2,6	19,0±1,1	24,2±1,3
Ширина входу в альвеолу, мкм	15,5±0,3	17,2±1,0	8,8±0,4	15,5±0,5
Площа поперечного перерізу альвеоли, мкм <sup>2</sup>	1083±17	879±95	536±13	657±17
Ширина просвіту РБ, АХ та АМ, мкм	87,4±3,7	67,8±6,1	47,6±3,7	69,8±3,7
Товщина міжальвеолярної перетинки, мкм	4,6±0,3	4,6±0,4	6,3±0,2*	5,4±0,3**

\*P<0,05 до Контролю, \*\*P<0,05 до BLM

Порушення нормальної архітектури тканин у щурів з BLM-індукованим фіброзом легені (Рис. 3.16) може бути пов'язано зі змінами складу колагену в дихальних шляхах (бронхах) цих тварин [107, 180]. Дійсно, кількісне визначення колагену, а також його розчинної та нерозчинної фракцій в бронхах експериментальних тварин виявило 2-кратне підвищення відсотка фракції зшитого колагену в загальному колагені бронхів у щурів з фіброзом порівняно з контролем (Рис. 3.17). Зміни вмісту/складу колагену в структурах легеневої тканини (дихальних шляхах) при фіброзі свідчать про важливу роль цього протеїну в розвитку досліджуваної патології. Цей показник у щурів групи BLM+SC не перевищував його значення в контрольній групі і, відповідно, був майже вдвічі нижчий ніж в групі BLM. При цьому споживання розчину 0,005% SC інтактними щурами призводило до зменшення кількості зшитого колагену в 3,8 рази порівняно з контрольною групою (Рис. 3.17), що свідчить про досить високу ефективність застосованої концентрації SC.



**Рис. 3.17.** Ступінь розчинності колагену (співвідношення вмісту нерозчинної та розчинної фракцій в загальному колагені) бронхів щурів інтактних та з BLM-індукованим легеневим фіброзом, за умов споживання тваринами семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n=3-7$ ,  $*P<0,05$  до Контролю,  $**P<0,05$  до BLM) [107].

– *Активність амінооксидаз в легені та крові щурів за умов блеоміцин-індукованого фіброзу*

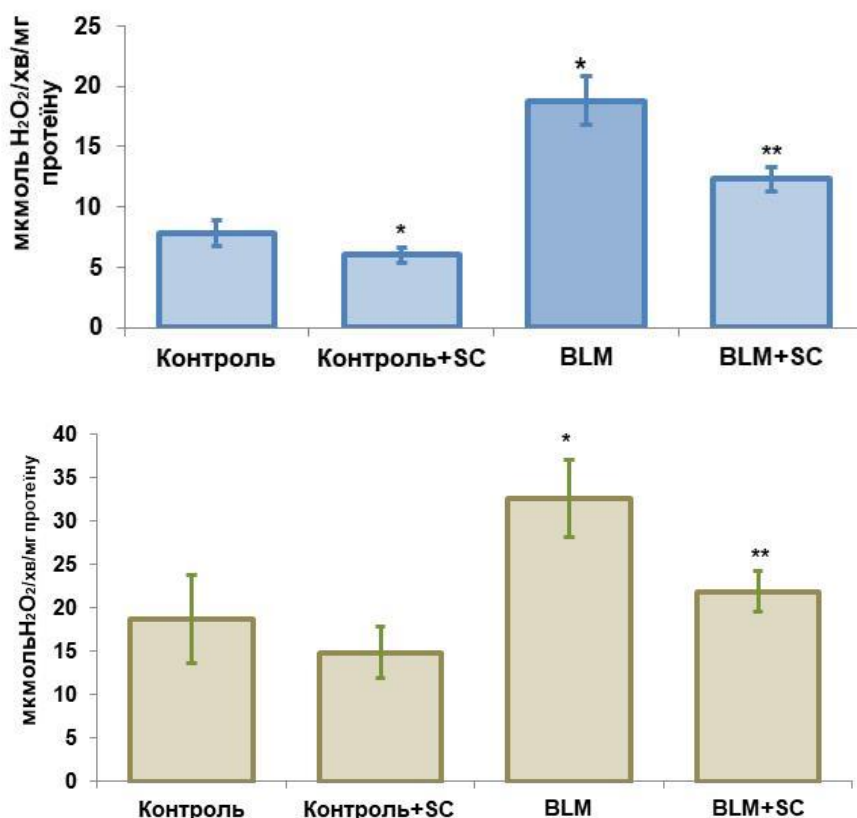
Фіброзно-деструктивні процеси в легеневій тканині позитивно корелювали зі змінами рівнів активностей амінооксидаз, що беруть участь у



формуванні ПКМ та ремоделюванні дихальних шляхів, LOX та SSAO. Як вже зазначалось та було показано у п.3.4 «Залучення мідь-вміснихамінооксидаз до розвитку патологічних змін за умов овалбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків», LOX є основним ензимом формування функціонально-структурної організації ПКМ. За патологічних умов надмірне активування даного ензиму може бути однією з головних причин деструктивних змін в легеневій тканині та ремоделювання дихальних шляхів. Водночас, можлива негативна роль SSAO у розвитку патологічних станів різного походження за рахунок індукування небажаного перехресного зшивання протеїнів ПКМ до кінця не з'ясована [107, 181].

Визначення рівнів активностей LOX та SSAO в легені щурів з BLM-індукованим фіброзом продемонструвало підвищення цих показників у 2,4 та 1,7 разів, відповідно, порівняно з контролем (Рис. 3.18 А, Б), що позитивно корелювало з виявленим гістологічно фіброзним пошкодженням тканин (Рис. 3.16) та із ступенем зшивання колагену (Рис. 3.17). В той же час, у зразках легеневої тканини тварин групи BLM+SC активності LOX та SSAO були відповідно у 1,4 та 1,6 рази нижчі ніж в групі BLM (Рис. 3.18 А, Б), що разом з результатами гістологічного аналізу та оцінкою вмісту/складу колагену в цій тканині підтверджує важливу роль LOX та SSAO у прогресуванні фіброзу. Рівні активностей цих ензимів у легені інтактних тварин, які вживали SC (Контроль+SC), не зазнавали достовірних змін порівняно з контролем [107].

Посилене перехресне зшивання колагену, основного протеїну ПКМ, та надмірне активування SSAO та LOX у легеневій тканині щурів із BLM-індукованим фіброзом свідчать також про залучення ЕМП до ремоделювання дихальних шляхів, оскільки компоненти ПКМ є одними з основних драйверів цього процесу [107, 182]. З іншого боку, нормалізація зазначених параметрів у групі тварин BLM+SC показала, що SC є залучений до індукування зворотного процесу МЕП через пригнічення активності LOX та SSAO.



**Рис. 3.18.** Рівні активностей лізилоксидази (LOX) (А) та семікарбазидчутливої амінооксидази (SSAO) (Б) у легеневій тканині інтактних щурів та з BLM-індукованим фіброзом за умов споживання тваринами семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n=3-7$ ,  $*P<0,05$  до Контролю,  $**P<0,05$  до BLM) [107].

Крім того, ми виявили суттєве зростання рівнів активностей інших досліджуваних АОаз у легені та крові щурів з BLM-індукованим фіброзом порівняно з контролем (Табл. 3.15). Як видно з таблиці, активність ензимів, що беруть участь у контролі запальних процесів, DAO в легені і SSAO в крові, у щурів з легеневим фіброзом зростала в однаковому ступені, в 1,8 рази, тоді як активність PAO підвищувалась в 3,4 рази в легені і в 1,4 рази. у крові порівняно з контролем (Табл. 3.15). Ці дані свідчать про те, що зростання рівня активності SSAO в легені (Рис. 3.18 Б) може корелювати з інфільтруванням клітин запалення в тканину органу-мішені завдяки другій функції ензиму як протеїну судинної адгезії лейкоцитів (VAP-1), тоді як підвищення активності DAO відповідає високим концентраціям медіатора запалення, гістаміну. Крім того, підвищення активності розчинної форми

SSAO у плазмі крові є результатом вивільнення каталітично активної частини молекули даного ензиму з пошкодженої тканини легені.

Крім того, в легені тварин з розвиненим фіброзом ми спостерігали зростання рівня активності PAO разом з активуванням DAO (Табл.3.15), що позитивно корелює з підвищеним вмістом поліамінів в цій тканині. Таким чином, підвищення активностей всіх досліджуваних АОаз може бути пов'язане з посиленням синтезу біогенних амінів і поліамінів за умов BLM-індукованого фіброзу і відповідає ознакам запалення та деструктивних змін тканин, що продемонстровано даними гістологічного та морфометричного аналізу (Рис. 3.16, табл.3.14).

**Таблиця 3.15.** Активності SSAO, DAO та PAO у легені та крові щурів інтактних та з BLM-індукованим легеневим фіброзом за умов споживання тваринами семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n = 3-7$ ) [107].

Ензими	Контроль	Контроль+SC	BLM	BLM+SC
Легеня				
DAO, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	8,35±1,37	3,99±1,08*	15,3±1,20*	6,15±0,58**
PAO, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	0,35±0,08	0,52±0,05	1,20±0,23*	1,07±0,14*
Кров				
SSAO, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	1,29±0,12	0,92±0,21	2,27±0,30*	1,60±0,24**
PAO, мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	0,081±0,017	0,111±0,011	0,149±0,023*	0,150±0,019**

\*P<0,05 до Контролю, \*\*P<0,05 до BLM

Як ми і очікували, рівень активності Cu-залежної DAO в легені тварин обох груп, які отримували SC, Контроль+SC та BLM+SC, був у 2,1 та 2,5 рази нижче порівняно з групами Контроль та BLM, відповідно, тоді як активність PAO не зазнавала змін під впливом SC як за умов норми, так і за умов патології (Табл.3.15). Активність іншої Cu-залежної АОаз, SSAO, в

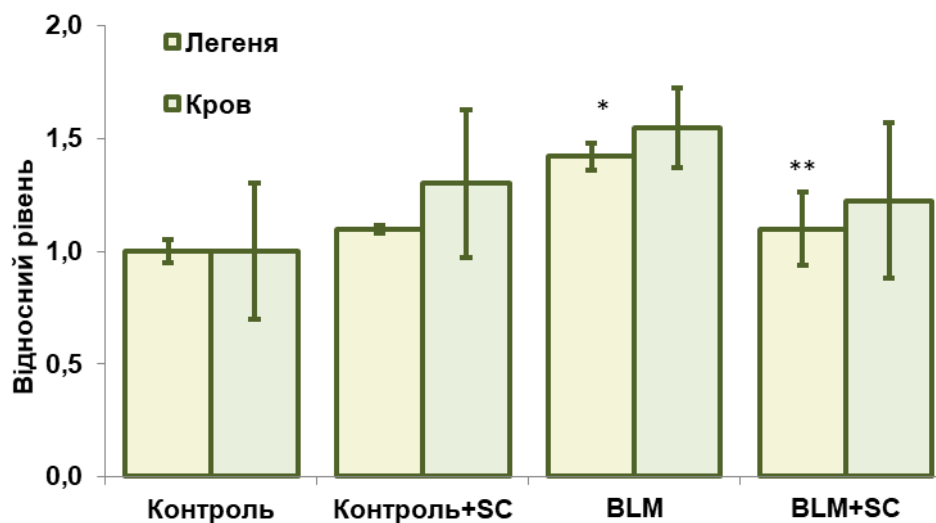
крові тварин цих груп, Контроль+SC та BLM+SC, в однаковому ступені, в 1,4 рази була нижчою порівняно з їх відповідними контролями. І навпаки, активність РАО в цій тканині інтактних і фіброзних щурів, не змінювалась на тлі споживання ними SC (Табл.3.15).

– *Маркери оксидативного стресу в легені та крові щурів за блеоміцин-індукованого фіброзу*

Як вже неодноразово зазначалось, АФК відіграють важливу роль у розвитку фіброзу. Існує кореляція між його рушійною силою, епітелійно-мезенхімним переходом (ЕМП), та вмістом цього класу високореактивних сполук [107, 183, 184]. Зокрема це відноситься і до використаної нами експериментальної моделі, що супроводжується надмірним генеруванням АФК та РКС [185].

Ступінь оксидативного стресу в крові та легені експериментальних тварин оцінювали за рівнем вільних радикалів в зразках цих тканин шляхом аналізу їх ЕПР спектрів. В легеневій тканині щурів з фіброзом спостерігалось достовірне підвищення у 1,4 рази даного показника порівняно з контролем (Рис. 3.17), що відповідає посиленню мітохондрійних процесів з генеруванням вільних радикалів убіхіноновими та семіхіноновими ділянками ЕТЛ, які на декілька порядків більш потужні за ті, що пов'язані з окисними процесами. у тварин групи BLM+SC рівень вільних радикалів в тканині органу-мішені досліджуваної патології був нижче значення цього показника в групі BLM у 1,3 рази і не відрізнявся від значення в контрольній групі, що свідчить про відсутність (стримування розвитку) оксидативного стресу в легені за умов прогресування фіброзу на тлі прийому SC (Рис. 3.19). Оскільки ми не виявили змін у рівнях вільних радикалів в групах негативного контролю та інтактних тварин, можна припустити, що SC за умов прогресування фіброзу пригнічував прооксидантну ланку метаболізму в органі-мішені, що також позитивно корелювало із відсутністю токсичності блеоміцину. У зразках крові тварин всіх експериментальних груп

достовірних змін рівня вільних радикалів порівняно з контролем не було виявлено (Рис. 3.19).



**Рис. 3.19.** Рівні вільних радикалів в легені та крові інтактних та з BLM-індукованим легенеvim фіброзом тварин за умов споживання семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n=3-7$ ,  $*P<0,05$  до Контролю,  $**P<0,05$  до BLM) [107].

Крім того, ми не виявили достовірних змін активностей про- та антиоксидантних ензимів у легені щурів з фіброзом порівняно з контролем, за винятком глутатіонпероксидази, рівень активності якої збільшувався в 1,4 рази (Табл. 3.16), що свідчить про відсутність необхідного компенсування антиоксидантною системою надмірного утворення вільних радикалів в тканині органу-мішені. У тварин з легенеvim фіброзом на тлі споживання SC (BLM+SC) майже у 2 рази був знижений рівень активності XO та 1,4 рази підвищувалась активність SOD1 відносно групи BLM (Табл. 3.16). Оскільки споживання SC інтактними тваринами не викликало достовірних змін у рівні цих показників (Контроль+SC) відносно контролю, можна вважати, що SC послаблював функціонування прооксидантної і посилював антиоксидантну ланки в легені за розвитку фіброзу і це позитивно корелювало з рівнем вільних радикалів в тканині органу-мішені за цих умов (Табл. 3.16).

В очищених лізатах еритроцитів щурів з індукованим фіброзом (BLM) виявлено зниження у 1,6-1,8 разів відносно контролю рівнів активностей SOD1 та CAT, що, вочевидь, пов'язано із зменшенням вмісту  $H_2O_2$ . Крім

**Таблиця 3.16.** Активність про- та антиоксидантних ензимів у легені та крові інтактних та з BLM-індукованим легеневим фіброзом щурів за умов споживання тваринами семікарбазиду та без ( $M \pm m$ ,  $n=3-7$ ) [107].

Ензим	Контроль	Контроль+SC	BLM	BLM+SC
Легеня				
ХО, мкмоль сеч.к- ти/хв/мг протеїну	1,03±0,16	0,61±0,29	0,89±0,18	0,52±0,11 <sup>*,**</sup>
SOD1, УО/мг протеїну	286±37	322±85	335±51	485±85 <sup>*,**</sup>
CAT мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	18,5±2,5	18,9±0,8	16,5±1,2	18,9±1,2
GPx мкмоль GSH/хв/мг протеїну	22,9±2,5	29,7±2,4 <sup>*</sup>	30,9±3,0 <sup>*</sup>	24,5±2,8
Кров				
ХО, мкмоль сеч.к- ти/хв/мг протеїну	0,87±0,18	0,73±0,25	0,44±0,1 <sup>*</sup>	0,57±0,07 <sup>*</sup>
SOD1, УО/мг протеїну	444±34	269±45 <sup>*</sup>	286±35 <sup>*</sup>	242±33 <sup>*</sup>
CAT мкмоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /хв/мг протеїну	248±10	119±22 <sup>*</sup>	136±14 <sup>*</sup>	139±14 <sup>*</sup>

\*P<0,05 до Контролю, \*\*P<0,05 до BLM

того, в плазмі крові цих тварин активність ХО також зазнавала зниження в такому ж ступені (Табл. 3.16), що позитивно корелювало з відсутністю достовірних змін у рівні вільних радикалів, а, відповідно, і ознак оксидативного стресу в цій тканині (Рис. 3.19). Можливо це пов'язано з тим, що BLM вводили щурам інтратрахеально. Тому, безпосередньо в крові, цей антибіотик не накопичувався і, відповідно, не виявляв свій токсичний вплив індукуванням оксидативного стресу в цій тканині. Прийом тваринами SC на тлі розвитку фіброзу легені (BLM+SC) не впливав на активності ХО, SOD1 та CAT в крові, ці показники були на рівні групи BLM. На тлі прийому SC в

крові інтактних тварин (Контроль+ SC) спостерігалось зниження рівнів активностей SOD1 та CAT відносно контролю у 1,8 та 2 рази, відповідно (Табл. 3.16), що можливо є наслідком акцептування семікарбазидом альдегідів і, таким чином, зниження рівня АФК. Але відсутність достовірних змін у рівні вільних радикалів в цій тканині тварин всіх експериментальних груп свідчить про її високу опірність до дії патологічних чинників.

Таким чином, отримані експериментальні дані узгоджуються з уявленням про те, що баланс між генеруванням оксидантів, одним з джерел яких є АОаз, та потужністю антиоксидантної системи в легені є вирішальним тригером пульмонологічного фіброзу.

### **Висновок №5.**

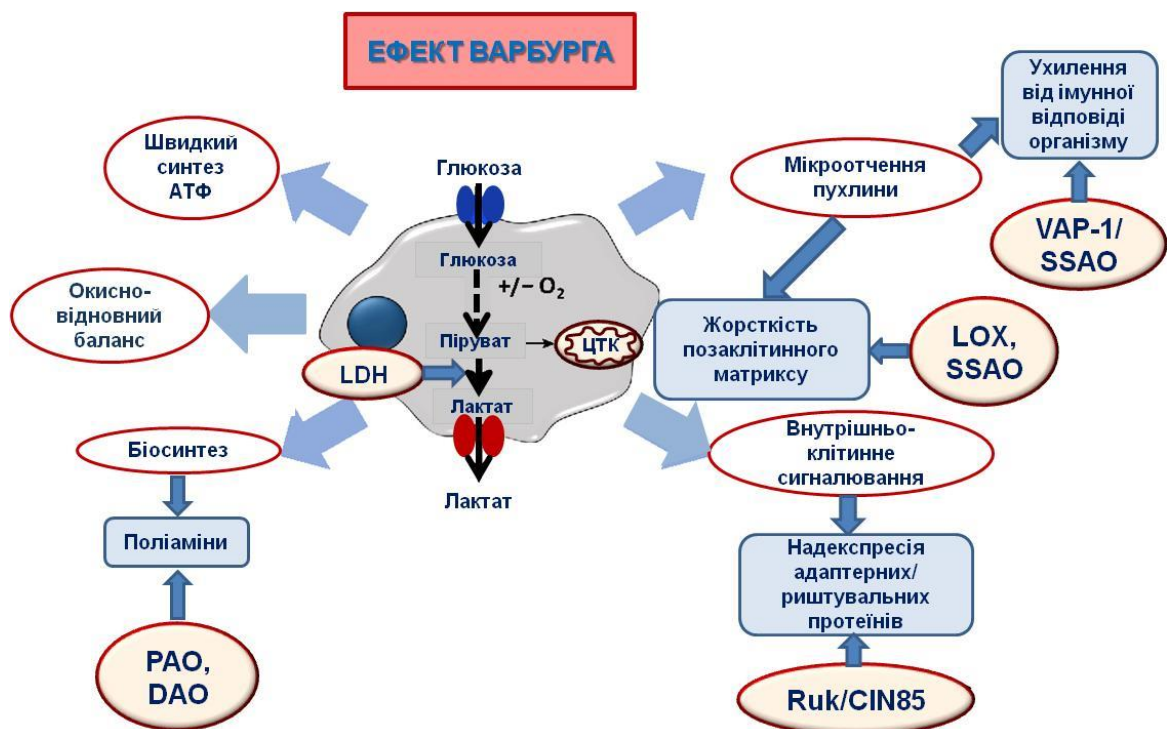
На моделі блеоміцин-індукованого фіброзу легені у щурів показано, що морфологічні ознаки розвитку патологічного стану органу-мішені супроводжуються підвищенням активностей всіх досліджених АОаз (SSAO, DAO, PAO, LOX). Встановлено, що споживання хворими тваринами 0,005% семікарбазиду (~1,0 мг/кг/добу) виявилось ефективним щодо послаблення ознак ремоделювання дихальних шляхів в результаті пригнічення активностей Cu-АОаз в легені тварин на 21-у добу після індукування патології.

### **3.6 Участь аміноксидаз у контролі агресивності фенотипу клітин карциноми легені Льюїс миші LLC**

Отримані на попередніх етапах роботи результати в експериментах *in vivo* продемонстрували, що перебіг гострих та хронічних захворювань нирки та легені супроводжуються суттєвим підвищенням рівнів активностей АОаз, SSAO, DAO, PAO, LOX, які можна розглядати патогенетичними чинниками досліджуваних хвороб. Для з'ясування внутрішньоклітинних молекулярних механізмів, що лежать в основі патологічних процесів, які ми спостерігали на рівні організму піддослідних тварин, на етапі №6 було використано модель високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс (LLC) миші з різним

ступенем агресивності, опосередкованої змінами рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

Для ракових клітин характерними є перебудови їх метаболізму, відомі як ефект Варбурга, що включають окисно-відновні процеси, гліколіз, біоенергетику, синтез поліамінів та інші (див. п.1.3 «*Метаболічний контроль агресивності пухлинних клітин*»). Таке метаболічне репрограмування разом з мікрооточенням клітин відіграє важливу роль у прогресуванні онкологічного процесу. З огляду на те, що до контролю більшості з перелічених процесів залучені АОази (Рис. 3.20), дослідження особливостей їх функціонування в ракових клітинах з різним ступенем агресивності є необхідним для з'ясування механізмів як внутрішньоклітинних, так і позаклітинних подій, які складають підґрунтя канцерогенезу.



**Рис. 3.20.** Потенційна участь амінооксидаз у контролі метаболічного репрограмування пухлинних клітин.

Результати попередніх досліджень, отримані у відділі сигнальних механізмів клітини, продемонстрували взаємозв'язок між малігнізацією пухлинних клітин та високими рівнями експресії адаптерного/риштувального протеїну Ruk/CIN85 [93, 186]. Тому постало завдання встановити



взаємозв'язок між зниженням агресивності високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс (LLC) миші за рахунок нокдауну адаптерного протеїну і метаболічними змінами, пов'язаними з ефектом Варбурга, та станом позаклітинного матриксу (ПКМ), зокрема тими, до яких залучені амінооксидази.

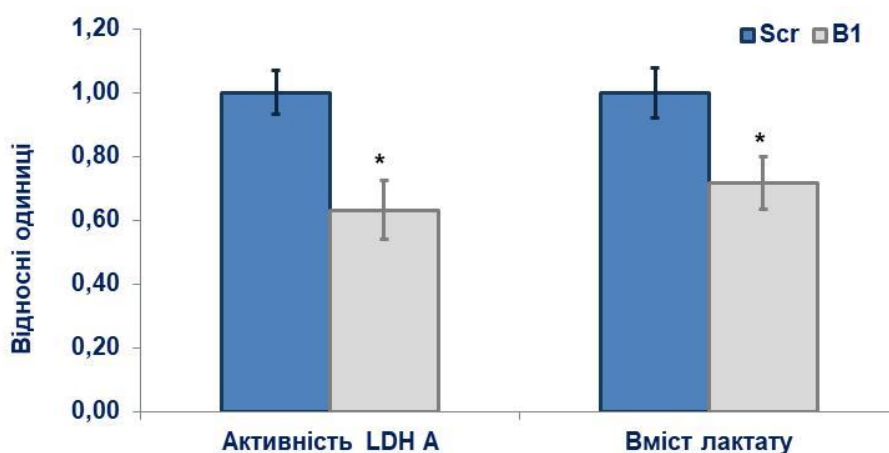
– ***Метаболічна характеристика агресивності клітин LLC***

Для дослідження метаболічних ознак, асоційованих зі зміною ступеня агресивності фенотипу ракових клітин, як модель ми використали клітини LLC зі стабільним пригніченням експресії Ruk/CIN85 (сублінія B1) та відповідні їм контрольні клітини (сублінія Scr). Ці сублінії було отримано у відділі сигнальних механізмів клітини за допомогою рекомбінантних лентивірусів, що кодують shRNA, специфічну до Ruk/CIN85 [186, 187]. Було показано, що зміни в рівні експресії Ruk/CIN85 у клітинах LLC миші зумовили відмінності в морфології окремих субліній. Клітини контрольної сублінії Scr характеризувалась мезенхімним фенотипом, тоді як клітини з пригніченою експресією адаптерного протеїну LLC-B1 набули змішаного епітелійно-мезенхімного фенотипу, з ознаками характерними для нормальних епітелійних клітин легені. Встановлено, що нокдаун Ruk/CIN85 в лінії LLC миші призводив до посилення їх проліферативної активності, збільшення адгезивності, пригнічення росту, а також зниженої рухливості, інвазивності та хіміорезистентності, що вказує на значне пригнічення ознак стовбуровості та змін у ЕМТ-залежній транскрипційній програмі *in vitro*, і, як наслідок, про зниження ступеня їх агресивності [186].

В ракових клітинах процес гліколізу значно порушений і на початкових стадіях онкологічного процесу дійсно відбувається за умов гіпоксії. Наступне прогресування росту пухлин супроводжується їх васкуляризацією, що сприяє нормальній оксигенації ракових клітин, які, тим не менш, за цих умов не припиняють отримання енергії ферментуванням глюкози до лактату. Саме це явище й спостерігав Отто Варбург в 1921 році та дав йому назву «аеробний

гліколіз», який виявляється в надпродукуванні лактату з пірувату в оберненій лактатдегідрогеназній реакції.

Було продемонстровано, що сублінія LLC B1 набула метаболічних особливостей, пов'язаних із пригніченням агресивного фенотипу. А саме, в цих клітинах рівень активності LDH A та вміст лактату в кондиційованому середовищі були достовірно знижені порівняно з цими значеннями в клітинах Scr у 2 та 1,5 рази, відповідно (Рис. 3.21), що вказує на взаємозв'язок між рівнем експресії адаптерного протеїну та інтенсивністю аеробного гліколізу в пухлинних клітинах.

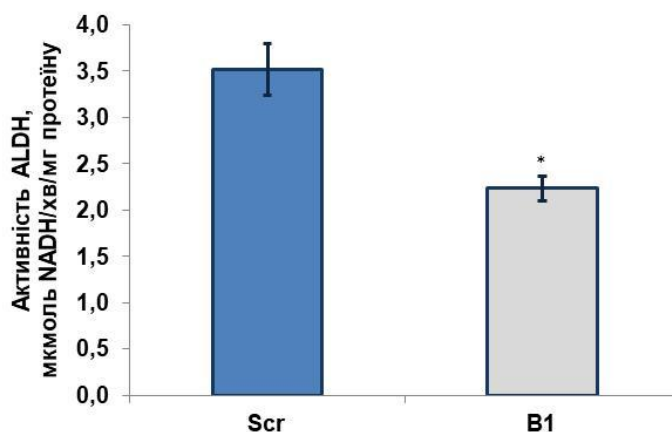


**Рис. 3.21.** Активність лактатдегідрогенази A в цитоплазматичних екстрактах та концентрація лактату в кондиційованому середовищі вирощування клітин карциноми легені Льюїс (LLC) контрольних (Scr) та із зниженим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (B1). Результати представлено у відносних одиницях, за одиницю прийнято значення показників в контрольних клітинах Scr, активність ензимів виражали в мкмоль  $H_2O_2$ /хв/мг протеїну ( $M \pm m$ ,  $n=4$ , \*  $P < 0,05$  відносно Scr)

Дослідженнями останнього десятиліття переконливо доведено, що популяції ракових стовбурових клітин (CSCs) характеризуються високими рівнями активності алкогольдегідрогенази (ALDH), надродини ензимів, які детоксикують різноманітні ендогенні та екзогенні альдегіди, альдегіди, необхідні для біосинтезу ретиноєвої кислоти та інших молекулярних регуляторів клітинних функцій, таких як резистентність до ліків, інвазивний

потенціал, диференціювання клітин та відповідь на оксидативний стрес. Отримані експериментальні дані дали підставу вважати ALDH одним з основних внутрішньоклітинних метаболічних маркерів стовбуровості ракових клітин [188].

Отримані на цьому етапі результати досліджень продемонстрували зниження активності ALDH у клітинах B1 приблизно в 2 рази, тоді як вміст альдегідів не змінювався порівняно з контрольними клітинами Scr (Рис. 3.22).



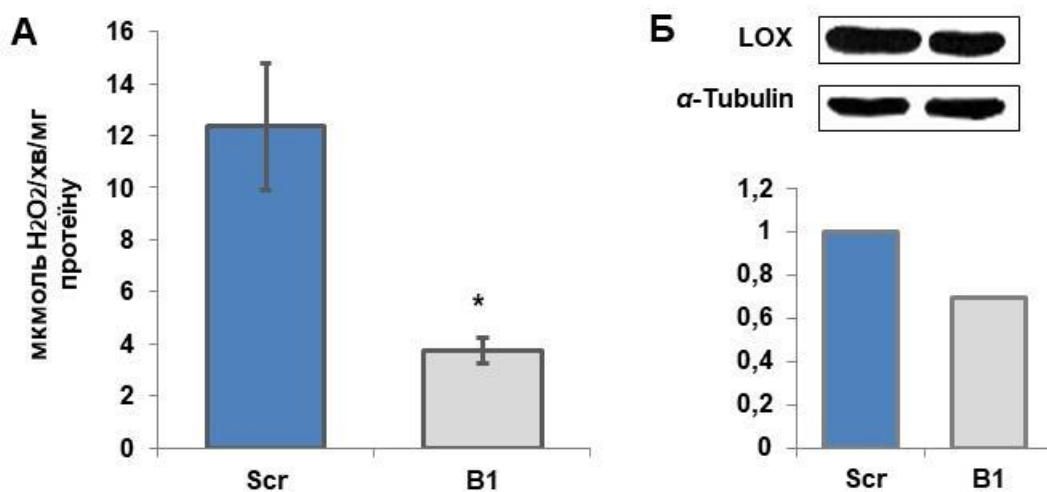
**Рис. 3.22.** Активність альдегіддегідрогенази (ALDH) в цитоплазматичних екстрактах клітин лінії LLC Scr та B1. ( $M \pm m$ ,  $n=4$ , \*  $P < 0,05$  відносно Scr).

Таким чином, основні метаболічні маркери агресивності фенотипу в клітинах LLC B1 виявились значно зниженими в порівнянні з контролем, що позитивно корелювало зі зниженням рівня експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85.

***– Активність амінооксидаз, залучених до контролю структурно-функціональної організації позаклітинного матриксу в клітинах LLC з різним ступенем агресивності***

На сьогодні нагромаджено великий масив експериментальних даних, які засвідчили критичну важливість депонування, посттрансляційної модифікації компонентів ПКМ та його локального ремоделювання в процесах метастазування. Як відмічалось неодноразово вище, LOX та SSAO

відповідають за перехресне зшивання молекул колагену, що сприяє їх дозріванню та формуванню фібрил. Крім того, було виявлено зв'язок між прогресією пухлинного росту та ступенем зшивання колагену, що призводило до підвищення жорсткості ПКМ внаслідок надмірного активування LOX [189]. При цьому стимулюються інтегрини, які індукують активування відповідних сигнальних шляхів, відповідальних за збільшення швидкості проліферування та інвазування як *in vitro*, так і *in vivo*. Всі ці ефекти послаблювались шляхом пригнічення активності LOX [189]. Нами встановлено, що в клітинах LLC-B1 рівень активності LOX в середовищі вирощування клітин достовірно знижувався у 3,3 рази відносно контролю (Рис. 3.23, А). Водночас, існують дані, що свідчать про залучення протеїнів родини LOX до інших внутрішньоклітинних функцій, зокрема контролю транскрипції [49]. Визначення вмісту протеїну LOX методом Вестерн-блот аналізу в загальних лізатах клітин виявило зниження цього показника в клітинах LLC-B1 на 33% відносно контрольних клітин (Рис. 3.23 Б).

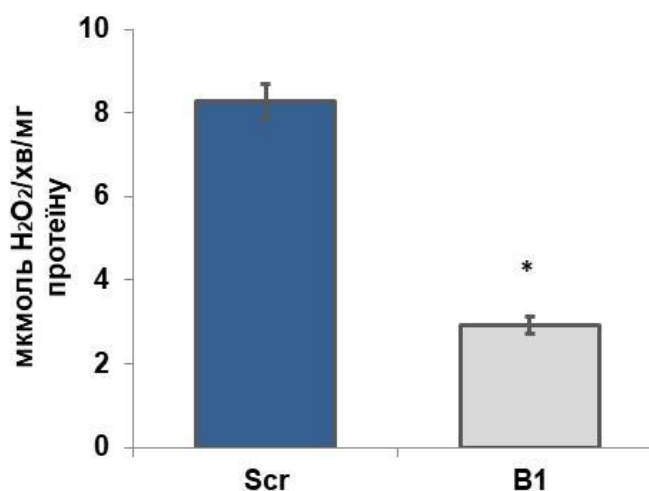


**Рис. 3.23.** Активність LOX в кондиційованому середовищі (А) та вміст протеїну LOX в лізатах клітин (Б) карциноми легені Льюїс (LLC) контрольних (Scr) та зі зниженим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (B1). ( $M \pm m$ ,  $n=4$ , \*  $P < 0,05$  відносно Scr).

Як зазначалось вище, ЕМП є процесом втрати епітелійними клітинами адгезивних властивостей та набуття міграційних, інвазивних властивостей,

що визначають мезенхімний фенотип. При цьому, як було показано, ракові клітини втрачають E-кадгерин та експресують інший маркер ЕМТ, протеїн Twist. Виявилось, що до регулювання експресії обох протеїнів в ракових клітинах різного тканинного походження залучені як LOX, так і LOXL2, що, як наслідок, вносить вклад до контролю процесу ЕМП [190, 191]. Таким чином, LOX як невід'ємна частина формування мікросередовища, може виступати маркером стану ПКМ та ступеня агресивності ракових клітин. Тому, отримані нами дані про зниження цього показника в клітинах LLC-B1 порівняно з контрольними, повністю відповідають пригніченню в цих клітинах ступеня агресивності.

Амінооксидаза SSAO/VAP-1 каталізує окисне дезамінування аліфатичних та ароматичних амінів з утворенням продуктів здатних посилювати злоякісний ріст та метастазування, а також інгібувати відповіді імунної системи на розвиток пухлини. Крім того, показана причетність цього ензиму до утворення міжпротеїнових зшивок у складі компонентів ПКМ. За результатами проведених досліджень встановлено зниження активності SSAO в клітинах LLC-B1 з нокдауном Ruk/CIN85 у 2,8 рази відносно цього показника в клітинах LLC-Scr (Рис. 3.24), що також можна розглядати як маркер часткової втрати цими клітинами ознак злоякісності.



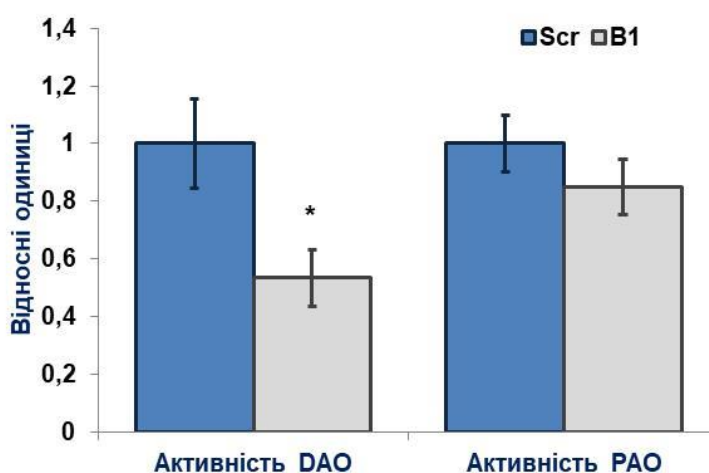
**Рис. 3.24.** Активність SSAO в цитоплазматичних екстрактах клітин карциноми легені Льюїс (LLC) контрольних (Scr) та зі зниженим рівнем

експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (B1). ( $M \pm m$ ,  $n=4$ , \*  $P < 0,05$  відносно Scr).

Таким чином, отримані дані свідчать, що процеси, які впливають на формування фенотипу ракових клітин, включають також ланки ремоделювання ПКМ та імунної відповіді, що відбуваються за участі Cu-АОаз, LOX та SSAO.

– *Активність амінооксидаз, залучених до обміну поліамінів в клітинах LLC з різним ступенем агресивності*

В сублініях клітин LLC було визначено також рівні активностей амінооксидаз, що беруть участь у катаболізмі поліамінів, DAO та PAO (Рис. 3.25). З досліджених АОаз цієї ланки метаболізму суттєвих змін зазнавала лише DAO, активність якої в клітинах LLC-B1 у 1,9 разів була нижчою ніж у контрольних клітинах.



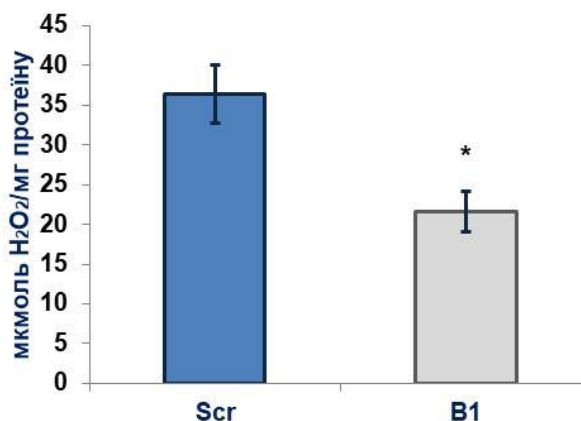
**Рис. 3.25.** Активність DAO та PAO в цитоплазматичних екстрактах клітин карциноми легені Льюїс (LLC) контрольних (Scr) та зі зниженим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (B1). Результати представлено у відносних одиницях, за одиницю прийнято значення показників в контрольних клітинах Scr, активність ензимів виражали в мкмоль  $H_2O_2$ /хв/мг протеїну ( $M \pm m$ ,  $n=4$ , \*  $P < 0,05$  відносно Scr) ( $M \pm m$ ,  $n=4$ , \*  $P < 0,05$  відносно Scr).

За даними джерел літератури існує регуляторний взаємозв'язок між рівнем поліамінів в тканинах та клітинах і канцерогенезом, а також інвазією пухлинних клітин [192], що вказує на причетність DAO та PAO до цього патологічного процесу. З одного боку, ці ензими підтримують необхідну концентрацію відповідних поліамінів, а з іншого – є джерелом сполук, токсичність яких зростає за умов розвитку патології [193]. Вміст путресцину і, відповідно, активність DAO в ракових клітинах помітно зростає. Відомо також, що DAO, бере участь у механізмах регулювання проліферації [194], тому зниження її активності сприятиме пригніченню проліферативного потенціалу клітин. Отримані нами дані повністю відповідають цим фактам. Слід зазначити, що в нашому дослідженні не виявлено достовірного зниження рівня активності PAO в клітинах LLC-V1 відносно контрольних клітин.

– *Показники оксидативного стресу в сублініях клітин LLC*

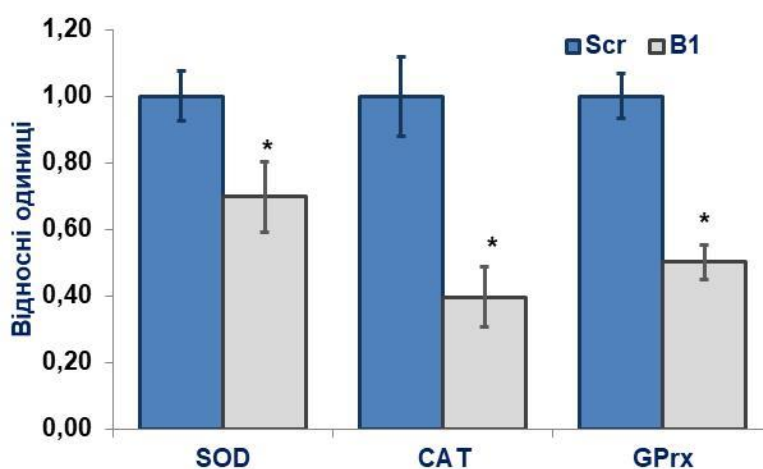
Ще одним маркером малігнізації ракових клітин є їх окисно-відновний стан. Надмірне генерування АФК, що спричиняє розвиток оксидативного стресу, та гіперактивування ензимів-антиоксидантів є характерними ознаками для високоінвазивних пухлинних клітин, доведено факт взаємозв'язку між ступенем оксидативного стресу та напрямком ЕМП [195, 196].

Пероксид водню, один з чинників оксидативного стресу, є, як вже зазначалось, продуктом реакції амінооксидаз. В такий спосіб, дані ензими виступають додатковим джерелом АФК і стимуляторами оксидативного стресу. Визначення рівня  $H_2O_2$  в досліджуваних сублініях клітин LLC продемонструвало достовірне зниження цього показника у 1,7 рази в клітинах LLC-V1 порівняно з контрольними клітинами (Рис. 3.26).



**Рис. 3.26.** Вміст H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клітинах лінії карциноми легені Льюїс (LLC) контрольних (Scr) та зі зниженим рівнем експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85 (B1). (M±m, n=4, \* P<0,05 відносно Scr).

Визначення рівнів активностей антиоксидантних ензимів, SOD, CAT та GPx, продемонструвало суттєве зниження цих показників в клітинах B1 у 1, 4, 2,5 та 2 рази, відповідно, в порівнянні з клітинами Scr, що позитивно корелювало зі зниженням вмісту пероксиду водню (Рис. 3.27).



**Рис. 3.27.** Рівні активностей антиоксидантних ензимів SOD, CAT та GPx в клітинах карциноми легені Льюїс (LLC) контрольних (Scr) та із зниженим рівнем експресії адапторного протеїну Ruk/CIN85 (B1). Результати представлено у відносних одиницях, за одиницю прийнято значення показників в контрольних клітинах Scr, активність ензимів виражали в мкмоль H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/хв/мг протеїну (M±m, n=4, \* P<0,05 відносно Scr) (M±m, n=4, \* P<0,05 відносно Scr).



Таким чином, послаблення ознак агресивності фенотипу високоінвазивних клітин LLC супроводжувалось також пригніченням рівня оксидативного стресу, внесок до якого додатково роблять АОази в реакціях окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів.

**Висновок №6.** На високоінвазивних клітинах карциноми легені Льюїс миші (LLC) показано, що зниження агресивності їх фенотипу в клітинах з down-регулюванням Ruk/CIN85 позитивно корелює зі ступенем вираженості ефекту Варбурга та профілем активностей досліджених АОаз, які контролюють проліферативний потенціал (DAO), жорсткість позаклітинного матриксу (LOX, SSAO), здатність уникати імунної відповіді (SSAO/VAP-1) та рівень оксидативного стресу (всі АОази), що підтверджує їх безпосередню причетність до контролю онкологічного процесу, загалом, та контролю стовбуровості й хіміорезистентності, зокрема.

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Представлена дисертаційна робота присвячена вивченню ролі амінооксидаз у розвитку захворювань нирки та легені. В реакціях окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів за участі АОаз одночасно утворюються високо реактивні сполуки, такі як пероксид водню, альдегіди та амоній. Залежно від рівнів генерування вони можуть виконувати як регуляторну роль, так і виступати індукторами широкого кола патологічних станів організму. З іншого боку, за цих умов в організмі багаторазово підвищуються рівні біогенних амінів та поліамінів, субстратів АОаз. Таким чином формується згубне коло посиленого генерування реактивних сполук, токсичність яких за умов патології стає загрозливою для підтримання нормального функціонування тканин органів-мішеней. Тому рівні активностей АОаз можуть виступати маркерами ступеня перебігу захворювання.

В рамках основних завдань дисертаційної роботи були досліджені чотири представники підкласу оксидоредуктаз, амінооксидази: SSAO, DAO, PAO та LOX. Зазначені ензими характеризуються специфічною субклітинною локалізацією, особливостями будови активного центру та природи приєднаного кофактору, а також субстратною специфічністю, що визначає їх індивідуальні функції та безпосередню участь у контролі важливих клітинних, фізіологічних та патологічних процесів. Зокрема, SSAO бере безпосередньо участь у інфільтруванні імунних клітин до осередків запалення тканин як адгезивний протеїн судин 1 (VAP-1). DAO є головним ензимом, що контролює рівні медіатора запалення гістаміну. Як наслідок, обидва ензими слугують маркерами запального процесу за умов розвитку патології різного генезу. PAO залучена до регулювання внутрішньоклітинних рівнів поліамінів, багатофункційних сполук, важливих насамперед для контролю процесів росту, проліферування та диференціювання. За умов їх надлишкових рівнів, PAO каталізує утворення високо цитотоксичних аміноальдегідів та пероксиду водню. Позаклітинна LOX – один з головних

ензимів, залучених до формування структурно-функціональної організації ПКМ, оскільки його компоненти, колаген та еластин, є субстратами даного ензиму. Патологічні стани сполучної тканини, асоційовані з надмірним генеруванням колагену активованими фібробластами, супроводжуються гіперактивуванням LOX, що, як наслідок, призводить до фіброзу тканини органу-мішені.

Порушення балансу між генеруванням та утилізацією продуктів АОаз, пероксиду водню та альдегідів, є рушійною силою розвитку оксидативно/карбонільного стресу, який на сьогодні є загально визнаним неспецифічним ініціатором ниркової патології. Крім того, третій продукт реакцій окисного дезамінування амінів, амоній, є потенційно небезпечним для організму, і тому його рівні за фізіологічних умов жорстко контролюються, насамперед залученням до синтезу амінокислот, зокрема аргініну, в печінці та нирках. Отже, за умов розвитку патології нирки може спостерігатися посилений амонієгенез, і одним з джерел його утворення можуть бути АОази. Залучення амонію до синтезу аргініну в нирці на ділянках близьких до центрів генерування амонію, робить його вірогідним попередником оксиду азоту, відомого своїми регуляторними функціями за умов норми та агресивним впливом за умов патології. Таким чином, АОази можуть забезпечувати утворення ще одного класу високо реактивних сполук, активних форм азоту, які за умов патології є індукторами нітрозативного стресу.

Припущення про нефротоксичність АОаз було підтверджено на двох моделях захворювань, органом-мішенню яких є нирка, таких як рабдоміоліз та цукровий діабет 1 типу, що супроводжуються розвитком гострої ниркової недостатності та хронічною хворобою нирки, відповідно. З іншого боку, для рабдоміолізу характерним є індукування потужного оксидативного стресу внаслідок вивільнення незв'язаного заліза (III) з міоглобіну пошкоджених міоцитів. Водночас, гіперглікемію за умов діабету можна вважати причиною потужного карбонільного стресу, який, у свою чергу, індукує окисні процеси

і розвиток оксидативного стресу. З'ясування можливості залучення АОаз як одного з джерел оксидативно/карбонільного та нітрозативного стресів до деструкції ниркової тканини за цих двох патологічних станів стало завданням першого етапу роботи.

Так, на моделях гліцерол-індукованого рабдоміолізу та стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету 1 типу у щурів було показано, що в нирковій тканині піддослідних тварин спостерігається суттєве, а іноді, і багаторазове активування АОаз (SSAO, DAO, PAO) та накопичення високих рівнів продуктів каталізованих ними реакцій. При цьому, на моделі рабдоміолізу продемонстровано позитивну кореляцію між ступенем прогресування захворювання та рівнями активності досліджуваних ензимів, що свідчило про безпосередню причетність надмірних рівнів реактивних альдегідів та пероксиду водню до деструктивних змін ниркової тканини, як наслідок розвитку карбонільно/оксидативного стресу.

Для встановлення потенційного внеску до діабетичної хвороби нирки ступеня розвитку оксидативного стресу ми застосували такий методичний підхід як механістичне поєднання обох патологічних станів, а саме, індукували рабдоміоліз у щурів з розвиненим діабетом 1 типу. При цьому ми очікували отримати адитивний ефект на біохімічні показники, насамперед активність SSAO, яку обрали як ідентифікований на попередньому етапі маркер патології нирки. Натомість, було отримано неочікуваний результат: активність SSAO в нирці, крові та печінці діабетичних тварин після індукування рабдоміолізу виявилась в межах норми. В цих тканинах спостерігалась нормалізація і низки інших показників оксидативно/карбонільного стресу. Взавши до уваги, що надмірне генерування амонію в нирці, зокрема за участі SSAO, може бути спряжене з посиленням на тих же ділянках тканини синтезу аргініну, попередника NO, ми припустили наявність взаємозв'язку між функціонуванням АОаз та метаболізмом АФА. Дійсно, визначення в тканинах піддослідних тварин показників нітрозативного стресу (метгемоглобіну (як наслідок окислення

Fe<sup>2+</sup> оксигемоглобіну NO), комплексу Hb-NO та 3-нітротирозину в плазмі крові, а також динітрозильних комплексів заліза в печінці) показало, що у щурів з діабетом багаторазово зростають ці маркери, тоді як індукування рабдоміолізу у діабетичних тварин призводило до збільшення лише зв'язаних, а тому неактивних форм NO. На підставі отриманих у цьому дослідженні даних ми припустили, що такий нормалізувальний ефект може бути пов'язаний зі зниженням в тканинах тварин надмірної кількості оксиду азоту за рахунок утворення його комплексів як з лабільним залізом (III), так і з залізом (II) у складі залізосірчаних кластерів протеїнів.

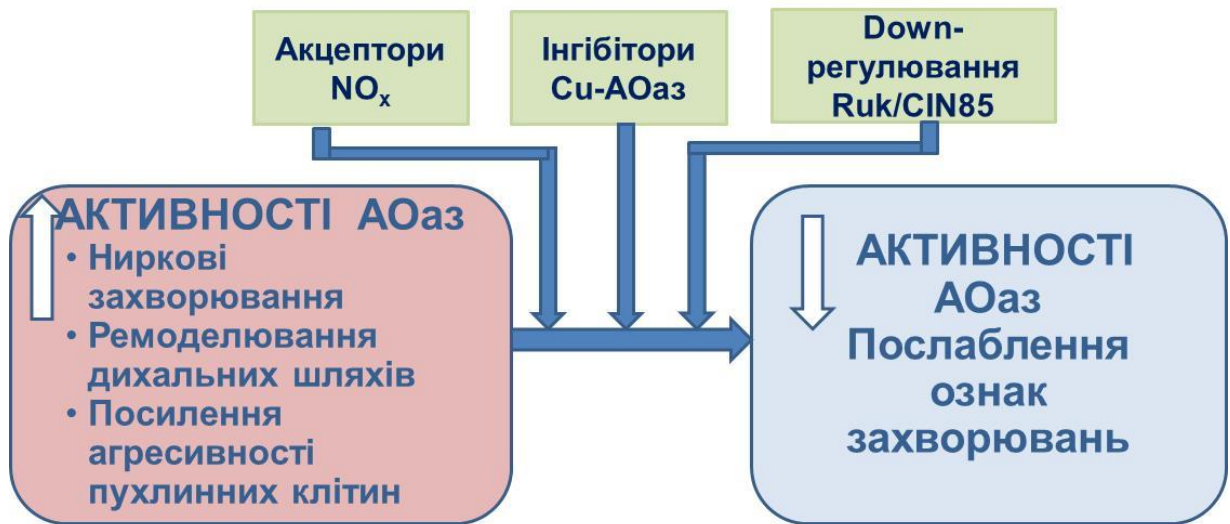
Це дало поштовх для пошуку агентів здатних пригнічувати активності амінооксидаз. Ми зупинили свій вибір на семікарабазиді – необоротному інгібіторі мідь-вмісних амінооксидаз (SSAO, DAO, LOX). В досліді *in vitro* методом диференційної спектроскопії було встановлено факт розкладання SC родиною ензимів CYP450 печінки щурів та визначено безпечну для організму концентрацію обраного інгібітора Cu-AOаз, що враховувалось в подальших дослідженнях.

На наступному етапі роботи на моделях захворювань дихальних шляхів, овальбумін-індукованій хронічній бронхіальній астмі у мурчаків та індукованого Блеоміцином С легеневого фіброзу у щурів, ми перевірили причетність АОаз (SSAO, DAO, PAO, LOX) до патологічних змін в тканині легені, іншого органу-мішені, із застосуванням семікарбазиду в обраних дозах. Тварини споживали семікарбазид на тлі розвитку відповідної патології. Визначення низки біохімічних показників (рівнів активностей АОаз, показників оксидативно/нітрозативного стресу), а також проведені гістологічні та морфометричні дослідження зразків легеневої тканини піддослідних тварин за моделювання обох патологічних станів дихальної системи продемонструвало, що розвиток ознак захворювань дихальної системи (інфільтрування у легеневу тканину клітин запалення, формування субепітеліального фіброзу, оксидативно/карбонільного та нітрозативного стресу) супроводжується підвищенням рівнів активностей всіх досліджених

АОаз. Споживання семікарбазиду *per os* тваринами за умов моделювання патології попереджало гіперактивування мідь-вмісних АОаз в легені та крові. При цьому, як наслідок, спостерігались набагато менш виражені ознаки проявів ремоделювання дихальних шляхів. Отримані дані дають підстави стверджувати, що мідь-вмісні амінооксидази залучені до розвитку проявів патології легені.

На наступному етапі для з'ясування молекулярних механізмів, що лежать в основі патологічних процесів в легеневої тканині за участі АОаз, які ми спостерігали на рівні організму піддослідних тварин, було використано модель *in cellulo* високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс (LLC) миші та клітин LLC зі зниженим ступенем агресивності, опосередкованим down-регулюванням експресії адаптерного протеїну Ruk/CIN85. Відомо, що контроль агресивності в пухлинних клітинах здійснюється на багатьох рівнях, зокрема метаболічному, відомому як ефект Варбурга. В процесах, асоційованих з метаболічним репрограмуванням ракових клітин беруть участь й досліджувані амінооксидази (SSAO, DAO, PAO, LOX), що чітко продемонстрували отримані результати. Таким чином, вкотре підтверджено позитивну кореляцію між ступенем важкості перебігу захворювання, в даному випадку малігнізацією пухлинних клітин, та рівнем активності ензимів, що вивчались.

Отримані експериментальні дані дозволяють стверджувати, що всі досліджені в рамках дисертаційної роботи АОази причетні до розвитку патологічних станів нирки та легені, а рівні їх активностей відповідають ступеню перебігу захворювання. Ці показники є маркерами змін у метаболізмі АФА та зазнають впливу *in vivo* специфічного інгібітора, семікарбазиду. Результати проведених досліджень можуть бути використані як експериментальний базис для пошуку та розробки сполук з високою інгібіторною активністю по відношенню до АОаз, що дозволило б підвищити ефективність програм комплексного лікування досліджуваних захворювань.



## ВИСНОВКИ

Проведено комплекс експериментальних робіт, які засвідчили участь ензимів амінооксидаз, які каталізують реакції окисного дезамінування біогенних амінів та поліамінів, у розвитку патологічних станів нирки та легені як органів-мішеней. Показано, що представники цього підкласу ензимів, що належать до оксидоредуктаз, безпосередньо залучені до регуляторних подій, які супроводжуються деструктивними змінами тканин відповідних органів, тоді як рівні активностей АОаз позитивно корелюють із ступенем важкості захворювання. Використаний як молекулярний інструмент необоротний інгібітор мідь-вмісних АОаз, семікарбазид, виявив здатність пригнічувати прояви досліджених патологічних станів легені.

1. Встановлено, що за умов індукованої гліцеролом ГНН багаторазове зростання активностей досліджених АОаз та антиоксидантних ензимів в нирці та тимусі відповідає ступеню важкості перебігу захворювання.

2. За умов моделювання цукрового діабету 1 типу у щурів виявлено багаторазове підвищення рівня активності SSAO в нирці та крові, що позитивно корелювало зі ступенем оксидативно/карбонільного та нітрозативного стресу, насамперед, рівнем вільного NO.

3. Показано, що розкладання семікарбазиду відбувається за участі CYP450 печінки щурів з продукуванням FA, NO та аміаку. Концентрація SC до 1,5 мМ не призводила до формування активного інтермедіату каталітичного циклу CYP450 з подальшим утворенням продуктів реакції.

4. Продемонстровано, що ремоделювання дихальних шляхів за овальбумін-індукованої бронхіальної астми у мурчаків супроводжується багаторазовим підвищенням в легеневій тканині та крові тварин рівнів активностей Cu-АОаз, SSAO, DAO, LOX. Споживання 0,05% семікарбазиду тваринами з бронхіальною астмою призводило до зменшення прояву ознак патології за рахунок інгібування досліджуваних ензимів.



5. На моделі блеоміцин-індукованого фіброзу легені у щурів показано, що морфологічні ознаки розвитку патологічного стану органу-мішені супроводжуються підвищенням активностей всіх досліджених АОаз (SSAO, DAO, PAO, LOX). Встановлено, що споживання хворими тваринами 0,005% семікарбазиду (~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.

6. На моделі високоінвазивних клітин карциноми легені Льюїс миші (LLC) показано, що зниження агресивності їх фенотипу в клітинах з down-регулюванням адаптерного протеїну Ruk/CIN85 позитивно корелює зі ступенем вираженості ефекту Варбурга, рівнем активності ALDH та профілем активностей досліджених АОаз, DAO, LOX, SSAO, що підтверджує їх безпосередню причетність до контролю онкологічного процесу, загалом, та контролю стовбуровості й хіміорезистентності, зокрема.

### Список використаних джерел

1. Toyoshima K, Imamura I, Doi S, Inoue T, Takamatsu I, Murayama N, Kameda M, Hayashida M and Fukui H. Plasma diamine oxidase activity in asthmatic children. *Allergology International*. 1996. 45:141-143
2. Reese I, Ballmer-Weber B, Beyer K, Fuchs T, Kleine-Tebbe J, Klimek T, Lepp U, Niggemann B, Saloga J, Schäfer C, Werfel T, Zuberbier T and Worm M. German guideline for the management of adverse reactions to ingested histamine. *Allergo J Int*. 2017; 26(2): 72–79.
3. Wang JY and Casero RA. *Polyamine cell signaling: Physiology, Pharmacology, and Cancer Research*. 2006. Humana Press. 490p. doi: 10.1007/978-1-59745-145-1.
4. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294(1):F1-9. doi: 10.1152/ajprenal.00424.2007.
5. Nevin BJ, Broadley KJ. Nitric oxide in respiratory diseases. *Pharmacol. Ther* 2002; 95:259-293.
6. Zhu B, Ma AQ, Yang L and Dang XM. Atorvastatin attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via suppression iNOS expression and CTGF (CCN2)/ERK signaling pathway, *Int. J. Mol. Sci*. 2013. 14. 24476-24491.
7. Noguchi S, Yatera K, Wang KY. Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respir Res*. 2014; 15:92.
8. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways. *Biochem Soc Trans*. 2001; 29 (2):345–349.
9. Weidinger A and Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress *versus* Signal Transduction. *Biomolecule*. 2015; 5(2): 472–484.
10. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest* 2003; 111:769–778,
11. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 4003–4008.

12. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, and Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:150–166.
13. Patwari P and Lee RT. Thioredoxins, mitochondria, and hypertension. *Am J Pathol* 2007; 170: 805–808.
14. Huseby NE, Asare N, Wetting S, Mikkelsen IM, Mortensen B, Sveinbjornsson B, and Wellman M. Nitric oxide exposure of CC531 rat colon carcinoma cells induces gammaglutamyltransferase which may counteract glutathione and cell death. *Free Radic Res* 2003; 37:99–107.
15. Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009; 47(5):469–484.
16. Zimniak P. Relationship of electrophilic stress to aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011; 51(6):1087–1105.
17. Yadav UCS and Ramana KV. Regulation of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2013; 2013:690545.
18. Dattilo S, Mancuso C, Koverech G, Mauro PD, Ontario ML, Petralia CC, Petralia A, Maiolino L, Serra A, Calabrese EJ, Calabrese V. Heat shock proteins and hormesis in the diagnosis and treatment of neurodegenerative diseases. *Immun. Ageing*. 2015, 12:20
19. Semchyshyn HM. Reactive Carbonyl Species *In Vivo*: Generation and Dual Biological Effects. *The Scientific World Journal*. 2014; 2014:417842, doi.org/10.1155/2014/417842.
20. Canuto RA, Ferro M, Muzio G, Bassi AM, Leonarduzzi G, Maggiora M, Adamo D, Poli G, Lindahl R. Role of aldehyde metabolizing enzymes in mediating effects of aldehyde products of lipid peroxidation in liver cells. *Carcinogenesis*. 1994; 15(7):1359-64. doi: 10.1093/carcin/15.7.1359.
21. Montefiori M, Jørgensen FS, and Olsen L. Aldehyde Oxidase: Reaction Mechanism and Prediction of Site of Metabolism. *ACS Omega*. 2017; 2(8):4237–4244.

22. Jalkanen S., Salmi M. Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *EMBO J.* 2001, 20(15):3893-3901.
23. Johnson BJ, Cohen J, Welford RW, Pearson AR, Schulten K, Klinman JP, and Wilmot CM. Exploring Molecular Oxygen Pathways in *Hansenula polymorpha* Copper-containing Amine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 2007, **282**(24):17767–17776, DOI 10.1074/jbc.M701308200.
24. Binda C, Mattevi A, Edmondson DE. Structure-Function Relationships in Flavoenzyme-dependent Amine Oxidations: A Comparison of Polyamine Oxidase and Monoamine Oxidase. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(27):23973–23976.
25. Stewart TM, Dunston TT, Woster PM, and Casero Jr RA. Polyamine catabolism and oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 2018; 293(48):18736 –18745.
26. Pällmann N., Braig M, Sievert H., Preukschas M, Hermans-Borgmeyer I, Schweizer M, Nagel CH, Neumann M, Wild P, Haralambieva E, Hagel C, Bokemeyer C, Hauber J and Balabanov S. Biological relevance and therapeutic potential of the hypusine modification system. *J. Biol. Chem.* 2015; 290, 18343–18360.
27. Mandal A, Mandal S, and Park MH. Genome-wide analyses and functional classification of proline repeat-rich proteins: potential role of eIF5A in eukaryotic evolution. *PLoS ONE* 9. 2014; 9(11):e111800.
28. Pegg AE. Functions of polyamines in mammals. *J Biol Chem.* 2016; 291(29): 14904–14912.
29. Fajardo I, Urdiales JL, Paz JC, Chavarría T, Sánchez-Jiménez F, Medina MA. Histamine prevents polyamine accumulation in mouse C57.1 mast cell cultures. *Eur J Biochem.* 2001; 268:768–773.
30. Casero RA Jr, Pegg AE. Polyamine catabolism and disease. *Biochem J.* 2009; 421(3): 323–338.
31. Casero RA Jr, Stewart TM, Pegg AE. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18(11):681–95.

32. Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition, ed by Lennarz WJ), 2013; Academic Press, USA. 168p.
33. Stark H. Histamine H4 Receptor: A Novel Drug Target in Immunoregulation and Inflammation. De Gruyter Open Poland. 2014. 368p.
34. Shen SH, Wertz DL, Klinman JP. Implication for Functions of the Ectopic Adipocyte Copper Amine Oxidase (AOC3) from Purified Enzyme and Cell-Based Kinetic Studies. *PLoS ONE*. 2012; 7(1):e29270.
35. Hadri KE, Moldes M, Mercier N, Andreani M, Pairault J, and Feve B. Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase in Vascular Smooth Muscle Cells. Differentiation-Dependent Expression and Role in Glucose Uptake. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002; 22(1):89-94. <https://doi.org/10.1161/hq0102.101550>.
36. Stolen CM, Yegutkin GG, Kurkijärvi R, Bono P, Alitalo K and Jalkanen S. Origins of Serum Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase. *Circulation Research*. 2004;95:50–57.
37. Boomsma F, Hut H, Bagghoe U, van der Houwen A, van den Meiracker A. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): from cell to circulation. *Med Sci Monit*. 2005;11(4):RA122-6.
38. Salmi M, Jalkanen S. VAP-1: an adhesin and an enzyme. *Trends in immunology*. 2001. 22(4): 211-216.
39. Csiszar K. Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol*. 2001; 70(1):32-38.
40. Cox TR, Erler J. The Importance of LOX Family Members on Modulating Cell-ECM Interactions in Carcinogenesis. *Carcinogene Mutagene*, 2013; 12:3-6.
41. Ma L, Huang C, Wang XJ, Xin DE, Wang LS, Zou QC., Zhang YS, Tan MD, Wang YM, Zhao TC. Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation. *Mol. Cell*. 2017; 65:296–309. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.002.

42. Trackman PC, Bedell-Hogan D, Tang J and Kagan HM. Post-translational Glycosylation and Proteolytic Processing of a Lysyl Oxidase Precursor. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:8666-8671.
43. Rucker RB, Kosonen T, Clegg MS, Mitchell AE, Rucker BR, Uriu-Hare JY, Keen CL. Copper, lysyl oxidase, and extracellular matrix protein cross-linking. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(5 Supp 1):996S-1002S. doi: 10.1093/ajcn/67.5.996S.
44. Tchapanian EH, Uriu-Adams JY, Keen CL, Mitchell AE, Rucker RB. Lysyl Oxidase and P-ATPase-7A Expression during Embryonic Development in the Rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2000. 379(1):71-77.
45. Finney J, Moon HJ, Ronnebaum T, Lantz M, Mure M. Human copper-dependent amine oxidases. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 546:19–32. doi: 10.1016/j.abb.2013.12.022.
46. Borel A, Eichenberger D, Farjanel J, Kessler E, Gleyzal C, Hulmes DJ, Sommer P, Font B. Lysyl oxidase-like protein from bovine aorta. Isolation and maturation to an active form by bone morphogenetic protein-1. *J Biol Chem.* 2001; 276:48944–48949. doi:10.1074/jbc.M109499200.
47. Trackman PC. Functional importance of lysyl oxidase family propeptide regions. *J Cell Commun Signal.* 2018; 12(1):45–53.
48. Yamauchi, M. and Sricholpech, M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem.* 2012; 52, 113–133. doi.org/10.1042/bse0520113.
49. Vallet SD and -Blum SR. Lysyl oxidases: from enzyme activity to extracellular matrix cross-links. *Essays in Biochemistry.* 2019; 63:349–364.
50. Lugassy J, Zaffryar-Eilot S, Soueid S, Mordoviz A, Smith V, Kessler O. and Neufeld G. The enzymatic activity of lysyl oxidase-like-2 (LOXL2) is not required for LOXL2-induced inhibition of keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 2012; 287, 3541–3549, doi.org/10.1074/jbc.M111.261016.

51. Iturbide A, Garc'ia de Herreros, A. and Peiro, S. A new role for LOX and LOXL2 proteins in transcription regulation. *FEBS J.* 2015; 282:1768–1773. <https://doi.org/10.1111/febs.12961>.
52. Santamaria PG, Floristan A, Fontanals-Cirera B, Vazquez-Naharro A, Santos V, Morales L, Yuste L, Peinado H, Garc'ia-G'omez A, Portillo F, Hernando E, Cano A. Lysyl oxidase-like 3 is required for ' melanoma cell survival by maintaining genomic stability. *Cell Death Differ.* 2018; 25:935–950, <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0030-2>.
53. Khan FY. Rhabdomyolysis: a review of the literature. *Neth. J. Med.* 2009; 67(9):272-283.
54. Шандренко СГ. Утворення пулу лабільного заліза в крові за рабдоміолізу в щурів. *Укр. біохім. журн*, 2012, 84(6):124-130.
55. Чумаченко ІМ, Капустяненко ЛГ, Шандренко СГ. Вплив лабільного феруму крові на розвиток нітрозативного стресу за умов експериментального рабдоміолізу у щурів. *Біологічні Студії*. 2012, 6(3):105-114.
56. Bagley WH, Yang H, Shah KH. Rhabdomyolysis. *Intern. Emerg. Med.* 2007; 2(3):210- 218.
57. Abboud HE, Ou SL, Velosa JA, Shah SV and Dousa TP. Dynamics of renal histamine in normal rat kidney and in nephrosis induced by aminonucleoside of puromycin. *J. Clin. Invest.* 1982; 69(2): 327-336.
58. Yu PH, Zuo DM. Oxidative deamination of methylamine by semicarbazide-sensitive amine oxidase leads to cytotoxic damage in endothelial cells. *Diabetes.* 1993; 42(4):594-603.
59. Yu PH, Zuo DM. Formaldehyde produced endogenously via deamination of methylamine. A potential risk factor for initiation of endothelial injury. *Atherosclerosis.* 1996; 120(1-2):189-197.
60. Sakata K, Kashiwagi K, Sharmin S, Ueda S, Igarashi K. Acrolein produced from polyamines as one of the uraemic toxins. *Biochem. Soc. Trans.* 2003; 31(2):371-374.

61. Lim AKH. Diabetic nephropathy – complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014; 7: 361–381.
62. Mount PF, Power DA: Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf)* 2006, 187(4):433–446.
63. Yu Q, Gao F, Ma XL: Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2011, 89(3):516–524.
64. Brodsky SV, Gao S, Li H, Goligorsky MS. Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283:H2130–H2139.
65. Dellamea BS, Leitão CB, Friedman R, Canani LH. Nitric oxide system and diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr.* 2014;6(17) doi: 10.1186/1758-5996-6-17. doi: [10.1186/1758-5996-6-17](https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-17)
66. Pacher P, Beckman J and Liaudet L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424, 2007.
67. Ceriello A. Oxidative stress and diabetes-associated complications. *Endocr. Pract.* 2006; 12(1):60-62.
68. Kangralkar VA, Patil SD, Bandivadekar RM. Oxidative stress and diabetes: a review. *Int. J. Pharm. Appl.* 2010; 1(1):38-45.
69. Bora S, Adole PS. Carbonyl stress in diabetics with acute coronary syndrome. *Clinica Chimica Acta.* 2021; 520:78-86.
70. Lemanske RF; Busse WW. Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125 (2):S95–102. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.047.
71. Hudkova O, Luhovskyi S, Drobot L, Latyshko N. Involvement of Cu-containing Amine Oxidases in the Development of Lung Pathology in Ovalbumin-Induced Bronchial Asthma in Guinea Pigs. *Ukr. Biochem. J.*, 2022, 94(3):26-38 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj94.03.026>
72. Muehling LM, Lawrence MG, and Woodfolk JA. Pathogenic CD4+ T cells in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2017; 140(6):1523–1540. doi:10.1016/j.jaci.2017.02.025.



73. Buzney CD, Gottlieb AB, Rosmarin D. Asthma and atopic dermatitis: a review of targeted inhibition of interleukin-4 and interleukin-13 as therapy for atopic disease. *J. drugs dermatol.* 2016. 15(2):165-71.
74. Gour N and Wills-Karp M. IL-4 and IL-13 Signaling in Allergic Airway Disease. *Cytokine.* 2015; 75(1): 68–78.
75. Rael EL and Lockey RF. Interleukin-13 Signaling and Its Role in Asthma. *World Allergy Organ J.* 2011 4(3): 54–64.
76. Prado CM, Martins MA and Tibério IFLC. Nitric Oxide in Asthma Physiopathology. *ISRN Allergy.* 2011; 2011: 832560.
77. Cho YS and Moon HB. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Asthma. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010 2(3):183–187.
78. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133:704–715.
79. Crabtree JS, Miele L. Breast Cancer Stem Cells. *Biomedicines.* 2018;6(3):77.
80. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science,* 2009; 324, 1029–1033.
81. Liberti MV and Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences,* 2016, 41(3): 211-218.
82. Soda K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30(1): 95. doi: 10.1186/1756-9966-30-95.
83. Goodwin AC, Destefano Shields CE, Wu S, Huso DL, Wu X, Murray-Stewart TR, Hacker-Prietz A, Rabizadeh S, Woster PM, Sears CL and Casero RA Jr. Polyamine catabolism contributes to enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced colon tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108:15354–15359.
84. Menendez JA, Joven J, Cufí S, Corominas-Faja B, Oliveras-Ferraros C, Cuyàs E, Martín-Castillo B, López-Bonet E, Alarcón T, Vazquez-Martin A. The

Warburg effect version 2.0: metabolic reprogramming of cancer stem cells. *Cell Cycle*. 2013; 12(8):1166-79. doi: 10.4161/cc.24479.

85. Babbar N and Casero RA Jr. Tumor necrosis factor- $\alpha$  increases reactive oxygen species by inducing spermine oxidase in human lung epithelial cells: a potential mechanism for inflammation-induced carcinogenesis. *Cancer Res*. 2006; 66(23):11125–11130.

86. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020, 38(2): 167–197; de la Vega MR, Chapman , Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell*. 2018; 34(1): 21–43.

87. Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through proteininteraction domains. *Science*. 2003. 300:445-452.

88. Lee MJ, Yaffe MB. Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 ; 8(6): a005918.

89. Gout I, Middleton G, Adu J, Ninkina NN, Drobot LB, Filonenko V, Matsuka G, Davies AM, Waterfield M, Buchman VL. Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *The EMBO Journal*. 2000; 19(15):4015-4025.

90. Take H, Watanabe S, Takeda K, Yu ZX, Iwata N, Kajigaya S. Cloning and characterization of a novel adaptor protein, CIN85 that interacts with c-Cbl. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 268:321–328.

91. Dikic I. CIN85/CMS family of adaptor molecules. *FEBS Lett*. 2002; 529(1):110-115.

92. Havrylov S, Redowicz MJ, Buchman VL. Emerging roles of Ruk/CIN85 in vesicle-mediated transport, adhesion, migration and malignancy. *Traffic*. 2010; 11(6):721-731;

93. Samoylenko A, Vynnytska-Myronovska B, Byts N, Kozlova N, Basaraba O, Pasichnyk G, Palyvoda K, Bobak Y, Barska M, Mayevska O, Rzhepetsky Y, Shuvayeva H, Lyzogubov V, Usenko V, Savran V, Volodko N, Buchman V, Kietzmann T, Drobot L. Increased levels of the HER1 adaptor protein

Rukl/CIN85 contribute to breast cancer malignancy. *Carcinogenesis*. 2012; 33:1976-1984.

94. Chen B, Borinstein SC, Gillis J, Sykes VW, Bogler O. The glioma-associated protein SETA interacts with AIP1/Alix and ALG-2 and modulates apoptosis in astrocytes. *J Biol Chem*. 2000; 275(25):19275-81.

95. Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature*. 2002; 416:187–190.

96. Soubeyran P, Kowanetz K, Szymkiewicz I, Langdon WY, Dikic I. Cbl- CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors. *Nature*. 2002; 416(6877):183-187.

97. Pasichnyk GV, Povorozniuk OO, Horak IR, Gerashchenko DS, Ponomarenko OV, Samoylenko AA, Byts NV, Drobot LB. Overexpression of adaptor protein Rukl/CIN85 in human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 is accompanied by increased chemoresistance. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr*. 2013; 12:149-156.

98. Horak IR, Pasichnyk GV, Gerashchenko DS, Knopfova L, Borsig L, Drobot LB. Cellular plasticity as a driving force in cancer progression: the regulatory role of adaptor protein Ruk/CIN85. *Ukr. Biochem. J*. 2018; 90 (3):102-103.

99. Horak IR, Pasichnyk GV, Gerashchenko DS, Knopfova L, Borsig L, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates manifestation of cancer stem cells (CSCs) features in mouse breast adenocarcinoma 4T1 cells. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr*. 2018; 12:101-109.

100. 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.

101. Shepard EM and Dooley DM. Inhibition and Oxygen Activation in Copper Amine Oxidases. *Acc. Chem. Res*. 2015; 48(5):1218-26. doi: 10.1021/ar500460z.

102. Ramsay RR, Tipton KF. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules* 2017, 22, 1192; doi:10.3390/molecules22071192
103. Стефанов О, Бухтіарова Т, Коваленко В та ін. Належна лабораторна практика. Державний фармакологічний центр МОЗ України. Київ, 2002. 155с.
104. Gudkova OO, Latyshko NV, Shandrenko SG. Amine oxidases as important agents of pathological processes of rhabdomyolysis in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, 88(1):79-87. <https://doi.org/10.15407/ubj88.01.079>
105. Hudkova O, Krysiuk I, Drobot L, Latyshko N. Rhabdomyolysis Attenuates activity of Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase, a Marker of Nephropathy in Rats with Streptozotocin-induced Diabetes. *Ukr. Biochem. J.*, 2022, 94(1):23-32 <https://doi.org/10.15407/ubj94.01.023>
106. Smith N, Broadely KJ. Optimization of the sensitization conditions for an ovalbumin challenge model of asthma. *Int. Immunopharmacol.* 2007; 7(2):183–190.
107. Hudkova OO, Krysiuk IP, Kishko TO, Popova NM, Drobot LB, Latyshko NV. Semicarbazide diminishes the signs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 2021, 93(5):72-81. <https://doi.org/10.15407/ubj93.05.072>
108. Kroeger-Koepke MB, Koepke SR, McClusky GA, et al. A-Hydroxylation pathway in the *in vitro* metabolism of carcinogenic nitrosamines: *N*-Nitrosodimethylamine and *N*-nitroso-*N*-methylaniline. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981; 78:6489-93.
109. Latyshko N, Gudkova O, Dmytrenko M. Semicarbazide as potential source of formaldehyde and nitric oxide formation. *Drugs and Therapy Studies.* 2012. (2:e9):43-47.
110. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by the hantzsch reaction. *Biochem J* 1953;55:416-21.

111. Sárdi E, Tyihák E. Relationship between dimedone concentration and formaldehyde captured in plant tissues. *Acta Biol Hung* 1998; 49:291-301.

112. Ghasemi A, Hedayati, Biabani H. Protein precipitation methods evaluated for determination of serum nitric oxide end products by Griess assay. *JMSR*. 2007; 2:30-1.

113. Yoshimura T, Kotake Y. Spin trapping of nitric oxide with the iron-dithiocarbamate complex: chemistry and biology. *Antiox Redox Signal* 2004;6:639-47

114. Davis LC, Radke GA. Chemically coupled spectrophotometric assays based on flow injection analysis: determination of nitrogenase by assays for creatine, ammonia, hydrazine phosphate and ditionite. *Anal Biochem*. 1984; 40:434-42.

115. Poulin P, Pelletier È. Determination of ammonium using a microplate-based fluorometric technique. *Talanta*. 2007; 71:1500-6.

116. Патент на корисну модель № u201806310. МПК (2018.01): C12Q 1/6886, C12N 5/10, C12N 5/095, C12N 5/09, C12N 5/16. Застосування стабільних субліній пухлинних клітин як моделі для тестування протипухлинних препаратів, скерованих на знищення ракових стовбурових клітин / Дробот Л.Б., Комісаренко С.В., Пасічник Г.В., Горак І.Р., Геращенко Д.С., заявник і патентовласник Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України – заявл. 06.06.2018 р.; Висновок про відповідність від 05.10.2018 р. № 25674/ЗУ/18.

117. Dakhama A, Chan NG, Ahmad HY, Bramley AM, Vitalis TZ, Hegele RG. Usefulness of bronchoalveolar lavage for diagnosis of acute and persistent respiratory syncytial virus lung infections in guinea pigs. *Pediatr Pulmonol*. 1998; 26(6):396-404.

118. Li S, Yang X, Li W, Li J, Su X, Chen L, Yan G. N-acetylcysteine downregulation of lysyl oxidase activity alleviating bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration*. 2012; 84(6): 509-517.

119. 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. <https://doi.org/10.15407/ubj90.05.098>
120. Гудкова ОО, Латишко НВ, Гудкова ЛВ, Михайловський ВО. Каталаза печінки щурів за умов штучного гіпобіозу. *Біополімери і клітина.* 2005; 21(1):28-35.
121. Horak IR, Hudkova OO, Latyshko NV, Kishko TO, Khudiakova OV, Krysiuk IP, Shandrenko SG, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects redox balance in breast cancer cells. *Ukr.Biochem.J.* 2020; 92(4):24-34. <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.024>
122. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 2001:appendix3:appendix 3B.
123. Beers RF Jr, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 1952; 195(1):133-140.
124. Johanson LH, Borg LA. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* 1990; 174(1):331-336.
125. Eriksson VJ, Borg LA. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against glucose-induced embryonic malformation *in vitro*. *Diabetologia.* 1991; 34(5):325-331.
126. Anderson RF, Patel K.B, Reghebi K, Hil SA. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase as a possible marker for hypoxia in tumors and normal tissues. *Br. J. Cancer.* 1989; 60(2):193-197.
127. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafemanand G, Hoekstra WG. Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973; 179:588-90.
128. Моин ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах.. *Лаб дело.* 1986; 12:724-27.

129. Koivula T, Koivusalo M, Lindros KO. Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem Pharmacol.* 1975; 24; 1807–11.
130. Hugo F, Mazurek S, Zander U, and Eigenbratt E. *In vitro* effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: Inhibition of glycolysis and cell proliferation. *J. of Cellular Physiology.* 1992; 153(3):539-549.
131. Зайдес АЯ, Михайлов АН, Пушенко ОИ. Модифицированный метод определения оксипролина. *Биохимия.* 1964. 29(1):5-7.
132. 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(1-2): 248-54.
133. Zaytseva OV, Shandrenko SG. Modification of spectrophotometric method of determination of protein carbonyl groups. *Ukr.Biochem.J.* 2012; 84(5):112-116.
134. Williams-Ashman HG, Canellakis ZN. Polyamines in Mammalian Biology and Medicine. *Perspectives in Biology and Medicine.* 1979, 22(3): 421-453.
135. Barbouti A, Vasileiou PVS, Evangelou K, Vlasis KG, Papoudou-Bai A, Gorgoulis VG, Kanavaros P. Implications of Oxidative Stress and Cellular Senescence in Age-Related Thymus Involution. *Oxid. Med. Cell. Longev.* Volume 2020, Article ID 7986071 <https://doi.org/10.1155/2020/7986071>
136. Hesterberg RS, Cleveland JL, and Epling-Burnette PK. Role of Polyamines in Immune Cell Functions. *Med Sci (Basel).* 2018; 6(1): 22. doi:10.3390/medsci6010022.
137. Latyshko NV, Gudkova LV, Gudkova OA. Effect of polyamines on superoxide dismutase activity under dexamethasone induced apoptosis in rat thymocytes. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2008; 80(3): 78-83.
138. Bachrach U, Heimer YM. *The Physiology of Polyamines*, Vol. 1. CRC Press Inc. 1989; 368 p.

139. Duperray A, Mantovani A, Introna M and Dejana E. Endothelial cell regulation of leukocyte infiltration in inflammatory tissues. *Mediators Inflamm.* 1995; 4(5):322-330.
140. Prousek J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.* 2007; 79(12): 2325- 2338.
141. Vetrano AM, Heck DE, Mariano TM, Mishin V, Laskin DL, Laskin JD. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(42): 35372-35381.
142. Токарчук КО. Участь альдегідів у розвитку оксидативного стресу *in vitro* та *in vivo*. Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. Київ, 2016, 20 с.
143. Iastrebova SA, Sergeeva VE, Spirin IV. Changes of biogenic amines in the thymus cell system after T-activin administration. *Morfologiya.* 2004;125(1):50-55.
144. Hesterberg RS, Cleveland JL, and Epling-Burnette PK. Role of Polyamines in Immune Cell Functions. *Med Sci (Basel).* 2018; 6(1): 22. doi:10.3390/medsci6010022.
145. Obata T. Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO) in the Brain. *Neurochemical Research.* 2002; 27(4): 263–268.
146. Hernandez-Guillamon M, Solé M, Delgado P, García-Bonilla L, Giralt D, Boada C, Penalba A, García S, Flores A, Ribó M, Alvarez-Sabin J, Ortega-Aznar A, Unzeta M, Montaner J. VAP-1/SSAO Plasma Activity and Brain Expression in Human Hemorrhagic Stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2012; 33:55–63.
147. Lamber MP. Platelets in liver and renal disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016; 2016(1): 251–255. doi: 10.1182/asheducation-2016.1.251.
148. Labudzynski DO, Zaitseva OV, Gudkova OO, Latyshko NV, Veliky MM. Vitamin D<sub>3</sub> contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver



of diabetic mice. *Ukr. Biochem. J.*, 2015, 87(3):75-90  
<https://doi.org/10.15407/ubj87.03.075>

149. 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.

150. Lieuw-A-Fa M M, van Hinsbergh VWM, Teerlink T, Barto R, Twisk J, Stehouwer CDA, Schalkwijk. Increased levels of Ne -(carboxymethyl)lysine and Ne-(carboxyethyl)lysine in type 1 diabetic patients with impaired renal function: correlation with markers of endothelial dysfunction. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19:631–636. 10.1093/ndt/gfg619

151. Boomsma F, Bhaggoe UM, van der Houwen AM, van den Meiracker AH. Plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase in human (patho)physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1647(1-2):48-54.

152. Mikkelsen RB and Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003; 22: 5734–5754.

153. Tian S, Liu J, Cowley RE, Hosseinzadeh P, Marshall NM, Yu Y, Robinson H, Nilges MJ, Blackburn NJ, Solomon EI, and Lu Y. Reversible S-Nitrosylation in an Engineered Azurin. *Nat Chem*. 2016; 8(7): 670–677.

154. *Radicals for Life: the Various Forms of Nitric Oxide*. (ed. by van Faassen E and Vanin AF). Elsevier B.V. All rights reserved. 2007. 442p. doi.org/10.1016/B978-0-444-52236-8.X5000-X.

155. Bandoowala M., Sengupta P. 3-Nitrotyrosine: A versatile oxidative stress biomarker for major neurodegenerative diseases. *International Journal of Neuroscience*, 2020; 1–25. doi:10.1080/00207454.2020.1713776

156. Bleier L, and Dröse S. Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2013; 1827(11–12):1320-1331.

157. Gödecke A. On the impact of NO–globin interactions in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research*. 2006; 69(2):309–317, doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.10.010
158. Buenger JW, Mauro VF. Organic nitrate-induced methemoglobinemia. *DICP*. 1989; 23(4):283-288.
159. Zotti FD, Lobysheva II, Balligand JL. Nitrosyl-hemoglobin formation in rodent and human venous erythrocytes reflects NO formation from the vasculature in vivo. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0200352. doi:10.1371/journal.pone.0200352
160. Morris SM Jr. Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *J. Nutr*. 2007; 137: 1602S–1609S.
161. Brosnan ME and Brosnan JT. Renal Arginine Metabolism. *J. Nutr*. 2004; 134: 2791S-2795S.
162. Wu G, Bazer FW, Kim SW, Li P, Rhoads JM., Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE and Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids*. 2009; 37(1):153–168. doi:10.1007/s00726-008-0210-y.
163. Weiner ID, Mitch WE, Sands JM. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015; 10(8):1444-58. doi: 10.2215/CJN.10311013
164. Дмитренко МП, Шандренко СГ, Петрунь ЛМ, Кішко ТО, Силонова НВ, Латишко НВ, Гудкова ОО, Сушкова ВВ. Обмін формальдегіду за семікарбазидної інтоксикації. *Укр. біохім. журнал*. 2010. 82(4):39-44.
165. Abernethy GA. Generation of semicarbazide from natural azine development in foods, followed by reaction with urea compounds. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2015; 32(9):1416–1430, 10.1080/19440049.2015.1067724
166. Lyles GA, McDougall SA. The enhanced daily excretion of urinary methylamine in rats treated with semicarbazide or hydrazine may be related to the inhibition of semicarbazide-sensitive amine oxidase activities. *J Pharm Pharmacol* 1989;41:97-100

167. Formaldehyde. Geneva, World Health Organization, 1989 (Environmental Health Criteria, No. 89).
168. Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun Z-R, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1647(1-2):193-9.
169. Pema PJ, Horak HA, Wyatt RH. Myelopathy caused by nitrous oxide toxicity. *Am J Neuroradiol.* 1998;19:894-6.
170. Walker V. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. *Adv Clin Chem.* 2014;67:73-150.
171. Clark D, Carruthers AM, Mustelin T and Murray LA. Matrix regulation of idiopathic pulmonary fibrosis: role of enzymes. *Fibrogenesis & tissue repair.* 2013. 6:20.
172. Schilter HC, Collison A, Russo RC, Foot JS, Yow TT, Vieira AT, Tavares LD, Mattes J, Teixeira MM, Jarolimek W. Effects of an anti-inflammatory VAP-1/SSAO inhibitor, PXS-4728A, on pulmonary neutrophil migration. *Respir Res.* 2015 Mar 20;16:42. doi: 10.1186/s12931-015-0200-z.
173. Masini E, Bani D, Marzocca C, Mateescu MA, Mannaioni PF, Federico R, Mondovì B. Pea Seedling Histaminase as a Novel Therapeutic Approach to Anaphylactic and Inflammatory Disorders. A Plant Histaminase in Allergic Asthma and Ischemic Shock. *TheScientificWorldJOURNAL. Novel Targets in Shock.* 2007, 7:888–902. DOI 10.1100/tsw.2007.139.
174. Shennib H, and Nguyen D. Bronchoalveolar lavage in lung transplantation. *Ann Thorac. Surg.*1991;51:33540.
175. Plastaras JP, Riggins JN, Otteneder M and Marnett LJ. Reactivity and Mutagenicity of Endogenous DNA Oxopropenylating Agents: Base Propenals, Malondialdehyde, and *N* $\epsilon$ -Oxopropenyllysine. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000, 13(12):1235–1242.
176. Zimny J; Sikora M; Guranowski A, Jakubowski H. Protective Mechanisms against Homocysteine Toxicity: the role of bleomycin hydrolase. *JBC.* 2006, **281**(32):22485–22492. [doi:10.1074/jbc.M603656200](https://doi.org/10.1074/jbc.M603656200)

177. Experimental and clinical progress in chemotherapy. Ed. by F.M. Muggia. Martinus Nijhoff Publisher. 1985. Boston. 263p.
178. Motoyoshi E, Seiichi O, Yasuhiro T, Takeya M, Suga M, Mori M, Gotoh T. Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003. 4: 1-33.
179. Фещенко ЮІ. Ідіопатичний легеневий фіброз: клініка, діагностика, лікування. МОЗ України, НАМНУ, Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи, Київ 2016, 38 с.
180. Bailey AJ, Peach CM, and Fowler LJ. Chemistry of the collagen cross-links. Isolation and characterization of two intermediate intermolecular cross-links in collagen. *Biochem. J*. 1970; 117:819-831.
181. Mercier N. The role of ‘semicarbazide-sensitive amine oxidase’ in the arterial wall. *Artery Research*. 2009; 3:141-147.
182. Giannoni E, Parri M, Chiarugi P. EMT and oxidative stress: a bidirectional interplay affecting tumor malignancy. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 16(11):1248-63. doi: 10.1089/ars.2011.4280.
183. Richter K, and Kietzmann T. Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell Tissue Res*. 2016; 365(3):591–605. doi: 10.1007/s00441-016-2445-3.
184. Cheres P, Kim S-J, Tulasiram S, and Kamp D W. Oxidative Stress and Pulmonary Fibrosis *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832(7):1028–1040.
185. Oury TD, Thakker K, Menache M, Chang LY, Crapo JD, Day BJ. Attenuation of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by a catalytic antioxidant metalloporphyrin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 25(2):164-9.
186. Hudkova O, Tokarchuk K, Latyshko N, Skaterna T, Gerashchenko D, Korshun R, Kishko T, Krysiuk I, Khudiakova O, Horak I, Drobot L. Metabolic reprogramming of Lewis lung carcinoma cells induced by down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 results in attenuation of their chemoresistance. “Current Problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology”, 6-7 October 2022, Dnipro, Ukraine “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної

біології та фізіології”, 6-7 жовтня 2022 р. Дніпро, Україна, Abstract book:183-185

187. Самойленко АА, Биць НВ, Пасічник ГВ, Козлова НВ, Базалій АВ, Геращенко ДС, Шандренко СГ, Воротніков ОВ, Кітцманн Т, Комісаренко СВ, Дробот ЛБ. Відповідь пухлинних клітин на пригнічення експресії адаптерного протеїну адаптерного протеїну Ruk/CIN85 рекомбінантними лентивірусами. *Biotechnol. acta*, 2013, 6(4):182-189.

188. Moreb JS. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2008. 3(4):237–246. Vassalli G. Aldehyde Dehydrogenases: Not Just Markers, but Functional Regulators of Stem Cells. *Stem Cells International*. 2019, 2019:3904645, <https://doi.org/10.1155/2019/3904645>.

189. Levental KR, Yum H, Kass L. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*. 2009; 139(5):891–906.

190. Baker AM, Cox TR, Bird D. The role of lysyl oxidase in SRC-dependent proliferation and metastasis of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 2011; 103(5):407–424.

191. Morrison CD, Parvani JG, Schiemann WP. The relevance of the TGF-beta paradox to EMT–MET programs. *Cancer Lett*. 2013; 341(1):30–40.

192. Pledge-Tracy A, Billam M, Hacker A. The role of the polyamine catabolic enzymes SSAT and SMO in the synergistic effects of standard chemotherapeutic agents with a polyamine analogue in human breast cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010; 65:1067–1081.

193. Babbar N, Murray-Stewart T, Casero RA. Inflammation and polyamine catabolism: the good, the bad and the ugly. *Biochem Soc. Trans.*, 2007. 35:300–304.

194. Xu F, Xu Y, Xiong J-H, Zhang J-H, Wu J, Luo J, Xiong J-P. AOC1 Contributes to Tumor Progression by Promoting the AKT and EMT Pathways in Gastric Cancer. *Cancer Management and Research*. 2020:12 1789–1798.

195. Jiang J, Wang K, Chen Y, Chen H, Nice EC and Huang C. Redox regulation in tumor cell epithelial–mesenchymal transition: molecular basis and

therapeutic strategy. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017; 2:e17036; doi:10.1038/sigtrans.2017.36.

196. Chatterjee R, Chatterjee J. ROS and oncogenesis with special reference to EMT and stemness. *European Journal of Cell Biology*. 2020. 99:151073. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151073>

**ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ  
ДИСЕРТАЦІЇ**

1. **Gudkova OO**, Latyshko NV, Shandrenko SG. Amine oxidases as important agents of pathological processes of rhabdomyolysis in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 2016, 88(1):79-87 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj88.01.079>
2. **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 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj90.05.098>
3. **Gudkova OO**, Krysiuk IP, Shandrenko SG. Innovative proposals on the implementation of dietary supplements for diabetes mellitus and helicobacteriosis. *Science and Innovation.* 2018, 14(5):37-42 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/scine14.05.034>
4. **Hudkova OO**, Krysiuk IP, Kishko TO, Popova NM, Drobot LB, Latyshko NV. Semicarbazide diminishes the signs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Ukr. Biochem. J.*, 2021, 93(5):72-81 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj93.05.072>
5. **Hudkova O**, Krysiuk I, Drobot L, Latyshko N. Rhabdomyolysis Attenuates activity of Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase, a Marker of Nephropathy in Rats with Streptozotocin-induced Diabetes. *Ukr. Biochem. J.*, 2022, 94(1):23-32 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj94.01.023>
6. **Hudkova O**, Luhovskyi S, Drobot L, Latyshko N. Involvement of Cu-containing Amine Oxidases in the Development of Lung Pathology in Ovalbumin-Induced Bronchial Asthma in Guinea Pigs. *Ukr. Biochem. J.*, 2022, 94(3):26-38 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj94.03.026>
7. Horak IR, **Hudova OO**, Latyshko NV, Kishko TO, Khudiakova OV, Krysiuk IP, Shandrenko SG, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 affects redox balance in breast cancer cells. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(4):24-34 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.024>

8. Horak IR, Latyshko NV, **Hudkova OO**, Tokarchuk KO, Kishko TO, Yusova OI, Drobot LB, Tykhomyrov AA. Adaptor protein Ruk/CIN85 regulates redox balance in 4T1 mouse breast cancer cells exposed to plasmin(ogen). *Experimental oncology*. 2022, 44(1):31-38 (SCOPUS). <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-1.17241>
9. Labudzynski DO, Zaitseva OV, **Gudkova OO**, Latyshko NV, Veliky MM. Vitamin D<sub>3</sub> contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver of diabetic mice. *Ukr. Biochem. J.*, 2015, 87(3):75-90 (SCOPUS). <https://doi.org/10.15407/ubj87.03.075>
10. Latyshko N, **Gudkova. O**, Dmytrenko M. Semicarbazide as potential source of formaldehyde and nitric oxide formation. *Drugs and Therapy Studies*. 2012. 2:e9, PP43-47. <https://doi.org/10.4081/dts.2012.e9>.
11. **Гудкова OO**, Латишко НВ, Гудкова ЛВ, Шандренко БС. Спосіб ензиматичного одержання кисню. Бюлл. №20. 2017. UA 119988 U.
12. **Gudkova. OA**, Latyshko NV, Portova PA. The rat thymocytes response to oxidative stress conditions. Матеріали VIII міжнародної науково-технічної конференції «Актуальні питання біологічної фізики та хімії» 23-27 квітня 2012р .м.Севастополь, с.169-170.
13. **Гудкова OO**, Латишко НВ, Токарчук КО, Чумаченко ІМ, Шандренко СГ. Особливості розвитку оксидативного стресу за комбінованої моделі цукрового діабету та рабдоміолізу. Матеріали XI Українського біохімічного конгреса. 2-6 жовтня 2014 р., м. Київ. *Ukr. Biochem. J.*, 2014, 86(5, Suppl. 1):146.
14. Parilova O, Latyshko N, **Gudkova O**, Shandrenko S. Semicarbazide-containing drug effect on extracellular matrix deposition in chronic ovalbumin-induced asthma through amine oxidase inhibition. 15th FEBS Young Scientists Forum and 40th FEBS Congress 2nd to 4th July 2015 in Berlin, Germany. abstract A-700-0014-00433. *The FEBS Journal*, 2015, v. 282, p. 132.



15. **Gudkova OO**, Zaitseva OV, Latyshko NV, Shandrenko SG. Attenuation of lysyl oxidase hyperactivity in rats' bleomycin-induced lung fibrosis. *Ukr. Biochem. J.*, 2018, 90(Special Issue):192.

16. Horak I, **Gudkova O**, Latyshko N, Khudiakova O, Shandrenko S, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a component of signaling networks that regulates breast cancer chemoresistance in concentrationdependent manner. The materials of 6<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. 18-21 June 2019, Yaremche, Ukraine. *Abstract book*: 20.

17. **Gudkova O**, Latyshko N, Kishko T, Khudiakova O, Horak I, Drobot L. Ruk/CIN85 adaptor protein as a regulator of oxidative /carbonyl stress in mice adenocarcinoma cell line 4T1. The materials of 6<sup>th</sup> Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation. 18-21 June 2019, Yaremche, Ukraine. *Abstract book*: 124<sup>a</sup>.

18. Horak I, **Gudkova O**, Latyshko N, 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. 30 вересня – 4 жовтня 2019 р, Тернопіль, Україна. *Медична та клінічна хімія*. 2019; **21**(3, додаток):77.

19. **Гудкова ОО**, Латишко НВ, Токарчук КО, Шандренко СГ. Молекулярні механізми патогенезу бронхіальної астми: внесок амінооксидаз. Матеріали XII Українського біохімічного Конгресу. 30 вересня – 4 жовтня 2019 р, Тернопіль, Україна. *Медична та клінічна хімія*. 2019; **21**(3, додаток):81.

20. **Hudkova O.**, Latyshko N., Skaterna T., Gerashchenko D., Korshun R., Tokarchuk K., Kishko T., Krysiuk I., Khudiakova O., Horak I., Drobot L. Down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 in Lewis lung carcinoma cells induces selective responses across metabolic networks associated with suppression of warburg effect. The 5<sup>th</sup> international scientific conference current problems of

biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020, Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*:57.

21. Horak I, Latyshko N, **Hudkova O**, Tokarchuk K, Kishko T, Krysiuk I, Khudiakova O, Skaterna T, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 is a potential driver of metabolic reprogramming in breast cancer cells. The 5<sup>th</sup> international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*:59.

22. **Hudkova O**, Latyshko N, Krysiuk I, Kishko T, Tokarchuk K, Popova N, Volodina T, Shandrenko S. Semicarbazide inhibits the signs of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. The 5<sup>th</sup> international scientific conference current problems of biochemistry, cell biology and physiology. 1-2 October, 2020 Dnipro, Ukraine. *Program and abstracts*:92.

23. Коршун РС, **Гудкова ОО**, Скатерна ТД, Горак ІР, Латишко НВ. Нокдаун адаптерного протеїну Ruk/CIN85 в клітинах карциноми легені Льюїс призводить до метаболічного репрограмування, асоційованого зі зниженням агресивності їх фенотипу. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2021”, Київ, 20-21 травня 2021, стор. 28.

24. Horak IR, **Hudkova OO**, Latyshko NV, Kishko TO, Shkoda MO, Kyrychenko MR, Korshun RS. Adaptor protein Ruk/CIN85 as a potent inducer of the Warburg effect in breast cancer cells. Збірник тез конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2021”, Київ 20-21 травня 2021, стор. 26.

25. Horak I, Skaterna T, Latyshko N, **Gudkova O**, Khudiakova O, Drobot L. Adaptor protein Ruk/CIN85 modulates expression/activity of enzymes involved in ECM reorganization and regulates invasiveness of cancer cells. Materials of the 27<sup>th</sup> Congress of the European Association for Cancer Research (09-12 June 2021, held online).

26. Horak I, **Hudkova O**, Latyshko N, Yusova O, Tokarchuk K, Bekala M, Drobot L, Tykhomyrov A. Exogenous plasminogen/plasmin affects

proliferation, motility, and redox balance in breast cancer cells depending on adaptor protein Ruk/CIN85 expression levels. *Oncology* 2021; 3:15-16. Materials of the young scientists conference "Modern oncology: from basic research to new therapeutic approaches", Kyiv, Ukraine, 12-13 October 2021.

27. Korshun RS, **Hudkova OO**, Latyshko NV, Kishko TO, Horak IR, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 participates in the metabolic control of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells. Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2022”, Київ 31 травня 2022. *Biotechnol. acta*, 2022; 15(2):58-59 <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.058>.

28. Bekala MI, Horak IR, **Gudkova OO**, Latyshko NV, Tokarchuk KO, Geraschenko DS, Shkoda MO, Drobot LB. Adaptor protein Ruk/CIN85 is involved in the glucose metabolism reprogramming in breast cancer cells. Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених “Актуальні проблеми біохімії і біотехнології – 2022”, Київ 31 травня 2022. *Biotechnol. acta*, 2022; 15(2):47-48. <https://doi.org/10.15407/biotech15.02.047>.

29. **Hudkova O**, Tokarchuk K, Latyshko N, Skaterna T, Gerashchenko D, Korshun R, Kishko T, Krysiuk I, Khudiakova O, Horak I, Drobot L. Metabolic reprogramming of Lewis lung carcinoma cells induced by down-regulation of adaptor protein Ruk/CIN85 results in attenuation of their chemoresistance. “Current Problems of Biochemistry, Cell Biology and Physiology”, 6-7 October 2022, Dnipro, Ukraine “Актуальні проблеми сучасної біохімії, клітинної біології та фізіології”, 6-7 жовтня 2022 р. Дніпро, Україна, Abstract book:183-185.