

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

**АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ КАТАБОЛІЗМУ ПУРИНІВ ТА СТАН
СИСТЕМИ АДЕНІЛОВИХ НУКЛЕОТИДІВ В МІТОХОНДРІЯХ НИРОК
ЩУРІВ ЗА УМОВ РІЗНОЇ ЗАБЕЗПЕЧЕНОСТІ РАЦІОНУ
НУТРИЄНТАМИ**

Дипломна робота
Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала: студентка VI курсу, групи 600-М
спеціальності 091-біологія (ОП Біохімія та
лабораторна діагностика)
АНДРІАНА СТЕПАНІВНА БОЙЧУК

Керівник: к.б.н., доц. О. М. Волощук

До захисту допущено:
Протокол засідання кафедри № ____
від „ ____ ” _____ 2022 р.

зав. кафедри _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці, 2022

АНОТАЦІЯ

Магістерська робота присвячена дослідженню активності ензимів катаболізму пуринів та стану системи аденілових нуклеотидів у мітохондріях нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону сахарозою та протеїном. Показано, що у мітохондріальній фракції нирок тварин за умов споживання низькопротеїнового раціону спостерігається достовірне зменшення концентрації АМФ на тлі збереження вмісту АТФ та АДФ порівняно з контролем. При цьому у нирках тварин за умов споживання низькопротеїнового раціону спостерігається підвищення 5'-нуклеотидазної активності на тлі збереження активностей АМФ-деамінази, ксантиноксидази та F₁F₀-АТФ-ази на рівні показників контролю. Водночас максимально виражені зміни у системі аденілових нуклеотидів характерні для нирок тварин, яких утримували на низькопротеїновій/високосахарозній дієті: спостерігається виснаження пулу всіх аденілових нуклеотидів на тлі максимального збільшення гідролазної активності F₁F₀-АТФ-ази. Крім того, у цитозольній фракції нирок щурів групи НПР/ВС зареєстровано найвираженіше підвищення АМФ-деаміназної, 5'-нуклеотидазної та ксантиноксидазної активностей.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що надмірне споживання сахарози на тлі аліментарного дефіциту протеїну супроводжується виснаженням системи аденілових нуклеотидів у мітохондріальній фракції та максимально вираженим підвищенням активностей ензимів катаболізму пуринів у цитозольній фракції нирок щурів, наслідком чого може бути дисбаланс енергозабезпечення клітин нирок з наступним порушенням їх функціональної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нирки, пуринові нуклеотиди, АМФ-деаміназа, 5'-нуклеотидаза, ксантиноксидаза

ABSTRACT

The master's thesis is dedicated to the study of the activity of purine catabolism enzymes and the state of the adenyl nucleotide system in the mitochondria of rat kidneys under conditions of varying supply of sucrose and protein in the diet. It was shown that in the mitochondrial fraction of the kidneys of animals under the conditions of consumption of a low-protein diet, a significant decrease in the concentration of AMP is observed against the background of preservation of the content of ATP and ADP compared to the control. At the same time, an increase in 5'-nucleotidase activity is observed in the kidneys of animals under the conditions of consumption of a low-protein diet, while the activities of AMP-deaminase, xanthine oxidase, and F1F0-ATPase remain at the level of control indicators. At the same time, the most pronounced changes in the system of adenyl nucleotides are characteristic of the kidneys of animals kept on a low-protein/high-sucrose diet: depletion of the pool of all adenyl nucleotides is observed against the background of a maximum increase in the hydrolase activity of F1F0-ATPase. In addition, the most pronounced increase in AMP-deaminase, 5'-nucleotidase and xanthine oxidase activities was recorded in the cytosolic fraction of the kidneys of rats of the NPR/BS group.

Therefore, the obtained results allow us to conclude that excessive consumption of sucrose against the background of dietary protein deficiency is accompanied by the depletion of the adenyl nucleotide system in the mitochondrial fraction and the maximally pronounced increase in the activity of purine catabolism enzymes in the cytosolic fraction of rat kidneys, which may result in an imbalance in the energy supply of kidney cells with subsequent impairment their functional activity.

KEY WORDS: kidneys, purine nucleotides, AMP-deaminase, 5'-nucleotidase, xanthine oxidase

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Особливості метаболічних процесів в організмі за умов білкової недостатності.....	7
1.2. Вплив високосахарозного раціону на перебіг метаболічних процесів.....	11
1.3. Роль аденілових нуклеотидів у нирках за фізіологічних та патологічних умов.....	19
1.4. Характеристика ензимів пуринового циклу та шляхи регуляції їх активності.....	28
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	35
2.1 Об'єкти та методи досліджень.....	35
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	42
ВИСНОВКИ.....	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	53
ДОДАТКИ.....	63

ВСТУП

Питання впливу дисбалансу макронутрієнтів на функціонування систем органів в останні десятиліття постає особливо гостро. У зв'язку із швидким темпом життя сучасної людини та зростанням населення Землі, у більшій частини людства спостерігається збільшення вживання простих вуглеводів, та, навпаки, зменшення кількості білка в раціоні, особливо тваринного походження. Такий дисбаланс у довготривалій перспективі веде за собою різноманітні патологічні зміни на рівні систем органів та цілого організму [1]. Надмірне надходження вуглеводів з раціоном сприяє розвитку метаболічного синдрому, а пізніше – діабету, однієї із найрозповсюдженіших хвороб ХХІ століття. Найчастіше на тлі збільшення вуглеводів у раціоні спостерігається дефіцит екзогенного протеїну, наслідки нестачі якого перш за все стосуються метаболізму власних білків та амінокислот організму, синтезу гормонів та нейромедіаторів. Білкова депривація впливає на процеси кровотворення, роботу серцево-судинної, імунної та інших систем, проте механізми розвитку патологічних станів залишаються не до кінця зрозумілими.

Недостатнє або надмірне постачання субстратів для енергозалежних метаболічних шляхів може призводити до активації деструктивних внутрішньоклітинних процесів чи апоптозу. Особливо чутливими до змін енергетичного метаболізму є печінка та нирки. Нирки є одним із основних гомеостатичних органів, тому їх стабільне енергетичне забезпечення є важливим для проходження біосинтетичних процесів, виділення кінцевих продуктів метаболізму, реабсорбції, підтримання електролітного балансу тощо [2]. Тому питання порушення енергетичної рівноваги, наслідком чого можуть стати зміни функціональної активності нирок, за умов нутрієнтного дисбалансу залишається відкритим.

Основу енергозабезпечення клітини складає система аденолових нуклеотидів, головною сполукою якої вважається аденозинтрифосфат (АТФ) – макроерг, який забезпечує проходження більшості ендотермічних реакцій в клітині. В ході анаболічних процесів утворюється аденозиндифосфат (АДФ) та

аденозинмонофосфат (АМФ), які здатні ресинтезуватись до АТФ. Підтримання сталості пулу аденілатів контролюється трьома метаболічними процесами: синтезом нуклеотидів *de novo*, ресинтезом АТФ у мітохондріях та катаболізмом аденілових нуклеотидів [3].

Мета роботи – визначення активності ензимів катаболізму пуринів та концентрацій АТФ, АДФ, АМФ у нирках щурів за умов різної забезпеченості раціону протеїном та сахарозою.

Для досягнення мети було поставлено такі **завдання**:

1. Визначити вміст аденілових нуклеотидів в мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами.

2. Визначити гідролазну активність протонної АТФ-ази у мітохондріях нирок тварин за умов дисбалансу макронутрієнтів.

3. Визначити АМФ-деаміназну, 5'-нуклеотидазну та ксантинооксидазну активності в цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону протеїном та сахарозою.

РОЗДІЛ I. Огляд літератури

1.1. Особливості метаболічних процесів в організмі за умов протеїнової недостатності

Нині протеїнова недостатність виявлена більш ніж у 1 мільйона осіб в економічно-розвинених країнах. Переважно причинами цього є стиль життя, неправильне харчування та споживання великої кількості напівфабрикатів. Білок є одним із трьох основних макронурієнтів, проте щоденний раціон більшості людей містить надмірну кількість жирів та легкозасвоюваних вуглеводів, що призводить до зниження кількості вжитих білків [1]. Нестача білка також є характерною для населення країн третього світу, проте причини її виникнення відрізняються: заміна тваринного білка неповноцінним рослинним, що спричиняє дефіцит окремих амінокислот у раціоні, а подекуди призводить до так званого «білкового голодування».

Білкова недостатність – це частковий або повний дефіцит протеїну чи есенціальних амінокислот, що може розвиватись внаслідок вроджених порушень метаболізму білка та набутих, таких як: посилення катаболізму білка порівняно з його синтезом, зниження інтенсивності всмоктування білка у тонкому кишечнику. Також однією із вагомих причин дефіциту білка є незбалансоване харчування чи голодування [4]. Відомо, що протеїни відіграють роль незамінних учасників біохімічних реакцій, оскільки вони є основними структурними одиницями клітини. Білковий дефіцит призводить до дисфункції метаболічних шляхів, які забезпечують життєдіяльність організмів.

Зменшення протеїну в щоденному раціоні веде до патологічних змін на рівні організму, окремих систем органів та метаболічних шляхів [4]. Що більш довготривалим є дефіцит білка в організмі, тим глибші метаболічні порушення виникають. За умов зниження надходження екзогенного білка порушується перед усім катаболізм та анаболізм власне протеїнів організму, оскільки харчовий білок містить незамінні амінокислоти, які потрібні для синтезу нових протеїнів. Під час дефіциту у печінці активується аутофагія власних білків, щоб забезпечити пул амінокислот для глюконеогенезу [5]. Дефіцит білка впливає на

інтенсивність інших метаболічних процесів, зокрема, окислення амінокислот з подальшою утилізацією аміаку [6]. Зменшення добової кількості білка у дієті на 0.1 мг/ кг маси тіла призводить до зниження секреції азоту на 16 мг/кг за добу [4].

Високий рівень білка модулює вміст триацилгліцеролів у печінці, що попереджує розвиток синдрому неалкогольно-жирової печінки. При низькопротеїновому раціоні порушується синтез глікогену, його резерв знижується в 4 рази порівняно з вживанням раціону, що містить достатню кількість білка. Дефіцит протеїну призводить до порушення гліколізу внаслідок зміни активності ключових ферментів цього метаболічного шляху [6].

Білок не виступає у ролі основного джерела енергії в клітині, але навіть невелике зниження його частки в дієті призводить до підвищення енергетичних потреб, що веде за собою збільшення вживання вуглеводів, ліпідів, та як наслідок, до ожиріння [7]. Протеїнова недостатність негативно впливає на синтез гормонів щитоподібної залози, оскільки кількість тироксину та трийодтироніну, які відіграють важливу роль у підтриманні сталої швидкості метаболічних процесів, прямо залежить від надходження білка з їжею [8]. Крім того, дефіцит білка супроводжується розвитком дисфункцій підшлункової залози. Зокрема, синтез важливого для регуляції вуглеводного обміну інсуліну теж порушується за умов білкової недостатності [7]. Хоча, з одного боку, кількість синтезованого інсуліну збільшується, проте, з іншого боку, підвищується інтенсивність його деградації.

Частка скелетних м'язів складає до 40% маси тіла людини і є головним резервом білків, тому нестача протеїнів у зрілому віці пов'язана із прогресією саркопенії. Починаючи від п'ятирічного віку м'язова маса знижується на 3-8% щороку. Перш за все, це пов'язано із неправильним харчуванням та зниженням кількості добової активності. При білковому дефіциті саркопенія розвивається швидко, що призводить до виникнення основного її симптому – фізичної втоми з нездатністю виконати звичні фізичні активності [9]. За умов білкового голодування спостерігається інтенсифікація часткового протеолізу білків

м'язової тканини до амінокислот, які надалі перетворюються до глюкози за участі ензимів глюконеогенезу [4]. Функціональність опорного апарату за умов тривалої білкової депривації теж знижується, оскільки відбувається зменшення міцності кісток та розвиток остеопорозу [10].

Як показано у літературі [11], зміна кількості харчового протеїну пов'язана із порушенням формування відчуття голоду та насичення. Високобілкова їжа сприяє зменшенню порції, потрібної для насичення, зниженню концентрації «гормону голоду» греліну в сироватці, що в свою чергу запобігає переїданню. Низькопротеїновий раціон впливає на процеси перетравлення власне білка шляхом зміни рН у просвіті кишечника. Відомо, що для забезпечення активності протеолітичних ферментів, зокрема амінопептидази, потрібен відповідний рівень рН у межах 8,0-8,3 [8].

Білковий метаболізм пов'язаний із синтезом білків крові: альбумінів, гемоглобіну та факторів зсідання крові, виникненням гіпертензії, регулює кількість вільних амінокислот у крові [12]. Протеїнова нестача впливає безпосередньо на поділ гемопоетичних клітин червоного кісткового мозку через затримку їх клітинного циклу у G_0/G_1 фазах.

Функціонування імунної системи теж порушується при білковому дефіциті. Зниження частки протеїну в раціоні до 7 % веде до порушення синтезу антитіл, цитокінів. Якщо відсоткове співвідношення білка у раціоні порівняно з іншими макронутрієнтами складає 3% – реалізація клітинної та гуморальної імунної відповіді не припиняється [13]. Незамінні амінокислоти необхідні для активації лімфоцитів, макрофагів, натуральних кілерів. У червоному кістковому мозку спостерігається зміна мікрооточення, що впливає на процес утворення лейкоцитів та інших клітин крові в цілому. Сформовані таким чином лейкоцити втрачають здатність синтезувати потрібну кількість цитокінів та пірогенів. Це гальмує розвиток запалення, що є необхідним сигналом для клітин імунної системи про наявність патогену в організмі [13]. Синтез білків гострої фази (БГФ), які продукуються в печінці у відповідь на наявність антигену в організмі, порушується за умов відсутності фенілаланіну

та триптофану – незамінних амінокислот, що в нормі надходять з екзогенним протеїном. Додатковим джерелом амінокислот для синтезу БГФ є скелетна м'язова тканина, тому під час перебігу інфекційного захворювання спостерігається втрата маси тіла [14]. Синтез компонентів системи комплементу також залежить від забезпеченості організму білком. Довгостроковий дефіцит харчового протеїну призводить до руйнування протеїнів системи комплементу [15].

Надходження достатньої кількості протеїну з раціоном є ключовим регулятором швидкості фільтрації у капсулі Шумлянського-Боумена. За умов споживання високобілкової їжі за нормального фізіологічного стану швидкість клубочкової фільтрації збільшується [15]. Механізм клубочкової фільтрації забезпечує онкотичний тиск, а коли концентрація білків у крові висока – спостерігається гіперфільтрація. Позитивним є те, що низькопротеїнова дієта допомагає знизити внутрішньоклубочковий тиск і нормалізувати швидкість фільтрації у людей із діабетичними ураженнями нирок [16]. Крім того, за умов нестачі протеїну в нирках активно відбуваються процеси трансамінування, що з одного боку знижує ризик ураження нирок надмірною кількістю аміаку та сечової кислоти [17]. З іншого боку, за наявності достатньої кількості необхідних кетокислот відбувається підтримання балансу відповідних амінокислот. За даними наукової літератури [18], під час додаткового вживання з раціоном кетокислот в нирках спостерігається синтез невеликої кількості деяких незамінних амінокислот, за виключенням треоніну та лізину, що додатково запобігає виведенню аміногруп за умов недостатнього забезпечення екзогенним протеїном.

Потреба у харчовому білку залежить також від фізіологічного стану (вагітність, висока фізична активність, діабет, ожиріння), статі, віку. Тому залежно від причини спостерігаються свої характерні ознаки розвитку протеїнової нестачі. Наприклад, за умов вагітності збалансованість харчування жінки є важливим показником здоров'я та правильного розвитку майбутньої дитини. При дефіциті протеїнів спостерігається погіршення загального стану не

тільки жінки, але і плоду, а саме збільшується ризик виникнення та розвитку ожиріння, інфекційних захворювань, дисфункції серцево-судинної системи, тощо [4]. Під час лактації молоко матері, у якої спостерігається білкова недостатність, містить більшу концентрацію лактози з паралельним зменшенням вмісту білків та жирів, що безпосередньо впливає на розвиток організму дитини [19].

За умов ожиріння раціон із високим вмістом білка допомагає керувати відчуттям голоду [11]. Певні есенціальні амінокислоти, наприклад, триптофан, необхідні для синтезу серотоніну і мелатоніну – регуляторів великої кількості процесів у ЦНС, які, зокрема беруть участь у формуванні харчової поведінки [13]. Разом із активним фізичним навантаженням, збільшення частки білка в дієті дозволяє знизити масу тіла, сприяє набору м'язової маси без жирових відкладень, а також зменшує період відновлення м'язового волокна після силових навантажень.

Отже, достатній вміст білка в раціоні є важливим для забезпечення правильного функціонування метаболічних шляхів у кожній із систем органів.

1.2. Вплив високосахарозної дієти на перебіг метаболічних процесів

Вуглеводи є загальнодоступним субстратом для синтезу енергії у живих організмах. Відомо, що цукор є незамінним компонентом майже всіх приготованих продуктів харчування, тому частка легкодоступних вуглеводів у щоденному раціоні суттєво збільшується. Моделювання високосахарозної дієти є актуальним для розуміння наслідків вживання високих концентрацій сахарози для фізіологічних процесів в організмі людини. Гіперглікемія, яка розвивається на тлі інтенсивного і тривалого надходження надлишку глюкози з раціоном, веде до таких патологій як інсулінорезистентність, метаболічний синдром, діабет, ожиріння, гостре ураження нирок тощо [2].

Близько 20% всієї глюкози, яка надходить в організм з їжею, перетворюється в печінці. В клітини печінки глюкоза потрапляє через інсуліно-незалежний транспортер GLUT2 шляхом полегшеної дифузії за градієнтом

концентрації [20]. У гепатоцитах глюкоза може перетворюватися у процесі глікогенезу на глікоген, або окислюватись для наступного утворення енергії шляхом гліколізу. Надмірна кількість субстратів всередині клітини використовується для участі в інших метаболічних перетвореннях або регулювання швидкості їх проходження. Гіпеглікемія призводить до посиленого утворення жирних кислот з паралельним інгібуванням їх окислення. Накопичення ліпідів у вигляді клітинних включень є однією з причин появи стеатозу, синдрому неалкогольно-жирової печінки, діабету, тощо [21]. Надмірне накопичення жирових включень в гепатоцитах індукує гіперкатехолемію, мітохондріальні дисфункції. У відповідь на збільшення кількості вільних жирних кислот у інтрацелюлярному просторі активуються місцеві макрофаги – клітини Купфера [22], які синтезують та виділяють прозапальні цитокіни TNF- α , IL-1 β , IL-6.

У відповідь на збільшення рівня глюкози в крові спостерігається вихід інсуліну, що регулюється також нервовими та ендокринними сигналами. Компенсаторне збільшення утворення інсуліну β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози у відповідь на підвищення концентрації глюкози у периферійному кровотоці веде до зниження інсуліносинтезуючої здатності панкреатоцитів внаслідок нестачі субстратів [23]. Якщо патологічні процеси у підшлунковій залозі незмінно тривають протягом довгого періоду часу, інсулінорезистентність трансформується у діабет 2 типу. Стабільне надходження великих кількостей екзогенної глюкози активує синтез та вихід у міжклітинний простір прозапальних цитокінів, внаслідок чого в підшлунковій залозі розвивається запальний процес [24].

Транспорт глюкози всередину клітин деяких тканин також регулюється інсуліном. Глюкоза, як і фруктоза, знижує експресію інсуліно-чутливого білка-транспортера за механізмом зворотного зв'язку, що призводить до розвитку інсулінорезистентності клітин [24]. За умов недостатнього синтезу інсуліну глюкоза надходить до тканин та органів в менших концентраціях, що є причиною активації процесів глікогенолізу, глюконеогенезу в печінці для

збільшення рівня глюкози у крові [25]. Окрім того, кількість інсулінозалежних рецепторів на поверхні клітин суттєво зменшується, а їх функціональність знижується. Це призводить до розвитку інсулінорезистентності та, як наслідок, нестачі субстратів для утворення достатньої кількості енергії у жировій та м'язовій тканинах [23].

Жирова тканина є однією з чутливих до інсуліну, тому клітини швидко реагують на коливання концентрацій цього гормону в крові. Інгібування активності ліполітичних ферментів у клітинах жирової тканини теж знаходиться під впливом інсуліну, тому активація процесів ліполізу за умов нестачі інсуліну призводить до збільшення концентрації триацилгліцеролів та вільних жирних кислот в кровотоці [26]. Вільні жирні кислоти є однією із причин розвитку окисного стресу в адипоцитах, наслідком чого є посилена активація синтезу TNF- α та IL-6. Ці хемокіни виділяються у відповідь активованими макрофагами та сприяють розвитку локального запалення.

Відомо, що висока концентрація глюкози в клітинах жирової тканини активує синтез жирних кислот *de novo*. Інтермедіати енергетичного обміну, зокрема, гліцерофосфат та ацетил-КоА разом із жирними кислотами беруть участь в процесі синтезу ліпідів. Внаслідок ліпогенезу відбувається гіпертрофія адипоцитів [28], а після досягнення критичного розміру, клітини жирової тканини виділяють паракринні фактори, які індукують синтез та розвиток нових преадипоцитів, отже, відбувається активна гіперплазія жирової тканини [27].

Для нормального функціонування скелетних м'язів субстрати для подальшого утворення АТФ мають надходити регулярно та у достатній кількості. Такі процеси як генерація та розвиток потенціалу дії, скорочення міофібрил та синтез білка суттєво залежать від достатнього та стабільного енергозабезпечення міоцитів. Одразу після прийому їжі основним енергетичним субстратом є глюкоза. Ще одним джерелом енергії для міоцитів у період голодування та за умов толерантності до інсуліну є вільні жирні кислоти, оскільки існують дані про накопичення триацилгліцеролів у скелетних

м'язах людей, хворих на ожиріння [28]. Проте короткочасне збільшення рівня глюкози до 10 мМ, що триває протягом 5 годин, веде до погіршення транспорту вуглеводів всередину міоцита. Це вважається одним із сигналів до розвитку інсулінорезистентності [29]. Інсулін відіграє провідну роль в активації процесів синтезу глікогену та в інгібуванні глікогенолізу. Гіперглікемія призводить до зниження м'язової мікросудинної перфузії, а погіршене кровопостачання є одним із факторів зниження біодоступності кисню для міоцитів.

У підтриманні стабільної концентрації глюкози в організмі за фізіологічних та патологічних умов вагому роль відіграють саме нирки. Одразу після прийому їжі приблизно 10% всієї глюкози, що надійшла, транспортується з током крові до нирок [30]. Однією із причин для такого розподілу є значна енергетична потреба для перебігу фізіологічних процесів в нирках. За умов надходження макронутрієнтів у недостатній кількості посилюється реабсорбція та транспорт потенційних субстратів для синтезу глюкози *de novo* до нирок з інших тканин та органів. Серед субстратів глюконеогенезу основними в нирках є саме глютамін, кетокислоти та гліцерол [30].

У подоцитах, ендотеліюцитах каналців нефрону та клітинах сполучної тканини нирок глюкоза інтенсивно використовується як найбільш доступне джерело енергії. Проте, гіперглікемія спричиняє порушення в роботі фільтраційної капсули нефрону, а саме гіпертрофію та втрату диференційних ознак подоцитів, їх відшарування від фільтраційного бар'єру [30]. Крім того, збільшення концентрації глюкози призводить до посилення генерації внутрішньоклітинних АФК у подоцитах, що запускає процес апоптозу. Внаслідок цього спостерігається підвищення проникності фільтраційного бар'єру нирок, що спричиняє розвиток альбумінурії та втрати макромолекул, які не здатні до реабсорбції у проксимальних каналцях.

Гіперглікемія спричиняє дилатацію приносних артеріол капсули Шумлянського-Боумена шляхом вивільнення інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1), NO, глюкагону та простагландинів, які відіграють роль вазоактивних медіаторів. Збільшена концентрація у крові ангіотензину II регулює рівень

вазоконстрикції еферентної артеріоли, що призводить до виникнення внутрішньогломерулярної гіпертонії клубочкових артеріол [31]. Внаслідок цього недостатнє кровопостачання за рахунок звуження артеріол веде до гіпоксії клітин кіркового шару нирок та синтезу АФК.

Реабсорбція глюкози відбувається у проксимальних канальцях проти градієнту концентрації методом вторинного активного транспорту з іонами Натрію за допомогою Na^+ -залежних транспортерів SGLT1 та SGLT2 [31]. Доведено, що за 24 години епітеліоцити канальців реабсорбують близько 160-180 г глюкози, а максимальна поглинальна здатність складає 425 г/добу. Тому за умов збільшення кількості глюкози у первинному фільтраті спостерігається інтенсифікації її повернення у кров, що веде до гіперглікемії [32]. Епітеліоцити проксимальних канальців нирок за фізіологічних умов майже не використовують глюкозу у ролі джерела енергії, оскільки постійно висока внутрішньоклітинна концентрація глюкози може стати джерелом для синтезу АФК або імпульсом до коливань осмолярності цитоплазми [32]. На базальній мембрані клітин проксимальних канальців нирок розташовані білки GLUT1 та GLUT2, які забезпечують транспорт глюкози в кров'яне русло. Але відомо, що глюкоза може запасатись у епітеліоцитах дистальних канальців нирок та в клітинах петлі Генле у формі глікогену. В нормі резерв глікогену в нирках мінімальний, проте за гіперглікемічного стану запаси глікогену значно збільшуються [33]. Клітини дистальних канальців нирок забезпечують реабсорбцію іонів та секрецію метаболітів, тому є залежними від метаболізму глюкози. Доцільність утворення з вільної глюкози глікогену може полягати в зменшенні неферментативного глікозилювання макромолекул, яке інтенсивно проходить в нирках за умов гіперглікемії.

Для покращення енергетичного забезпечення клітини системи канальців нирок використовують в якості субстрату для синтезу енергії вільні жирні кислоти [33]. Епітеліоцити проксимальних канальців нефрону чутливі до зниження концентрації кисню, оскільки процес β -окислення жирних кислот потребує значного кисневого забезпечення. Окислення вуглеводів не покриває

значних енергетичних потреб органу, тому за умов додаткового інгібування окислення жирних кислот в нирках спостерігається зниження рівня реабсорбції з подальшою деструкцією проксимальних каналців [34]. Зниження активності ензимів β -окислення в клітинах нирок веде до накопичення вільних жирних кислот, що сприяє розвитку тубулоінтерстеціального фіброзу – патологічного стану, за умов розвитку якого спостерігається інфільтрація макрофагів та Т-лімфоцитів в міжклітинний простір навколо каналців. Виділення трансформуючого фактору росту $\beta 1$ (TGFB1) стимулює загибель епітеліоцитів, інтенсивний поділ фібробластів та синтез колагену, що призводить до втрати каналцями їх первинної структури та основних функцій [34].

За умов гіперглікемії відбувається інгібування активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (ЕС 1.1.1.49) – ключового ензиму пентозофосфатного шляху, який в нормі активно функціонує у нирках. Внаслідок цього спостерігається виснаження цитозольного пулу NADPH, що призводить до погіршення здатності антиоксидантної системи за участі глутатіону протидіяти розвитку окисного стресу [35].

Фруктоза – моносахарид, який може міститись у високих концентраціях в багатьох продуктах харчування, а також утворюється ендогенно внаслідок гідролізу отриманої із раціоном сахарози. Частка фруктози в дієті за останнім часом зросла від 20% до 60-150% на добу [36], основним чином через збільшення споживання рафінованого цукру. Крім того, порівняно з глюкозою фруктоза має нижчий глікемічний індекс, що призвело до її інтенсивного використання для приготування продуктів для хворих на діабет. Проте, сучасні біохімічні дослідження доводять, що збільшення кількості фруктози в щоденному раціоні веде до функціональних порушень метаболічних процесів в системах органів людини, зокрема нирках та печінці.

Нормальна концентрація фруктози в периферійній крові після її транспорту до тканин органів складає 0,05 мМ [36], проте надмірне споживання фруктози з їжею призводить до збільшення її концентрації у сироватці крові, що є однією із причин розвитку метаболічного синдрому. Основними органами,

які забезпечують метаболізм фруктози, є печінка (80%) та нирки (20%). Транспорт фруктози через плазматичну мембрану клітин нирок забезпечується низкою переносників, зокрема GLUT2, GLUT5 та SGLT5. Доведено, що їх експресія в клітинах нирок підвищується за умов надлишкового надходження саме фруктози [37].

Фруктоза є основним субстратом для синтезу жирів *de novo* у печінці, що пов'язано, перш за все, з виникненням синдрому неалкогольно-жирової печінки. Як показано у літературі [38], фруктоза впливає на активацію транскрипційних факторів з метою збільшення експресії ензимів, які відповідають за синтез ліпідів, зокрема синтази жирних кислот (ЕС 2.1.1.79) та ацетил-КоА-карбоксилази (ЕС 6.4.1.2).

Крім того, існують дані про інгібуючий ефект високих концентрацій фруктози на глікогенфосфорилазу (ЕС 2.4.1.1) – ключовий ензим глікогенолізу, який каталізує приєднання фосфатного залишку до глюкози у складі глікогену з наступним відщепленням молекули глюкозо-1-фосфату. За умов надлишку фруктози у клітині спостерігається накопичення інтермедіату – фруктозо-1-фосфату, який інгібує глікогенфосфорилазу. Зниження активності ензиму спостерігається також при накопиченні всередині клітини глюкозо-6-фосфату, який активує глікогенсинтазу (ЕС 2.4.1.11). Отже, за умов посиленого надходження сахарози з раціоном відбувається паралельна регуляція процесів глікогенезу та глікогенолізу [38].

Фруктоза є одним із чинників виникнення метаболічного синдрому, ознаками якого є інсулінорезистентність, дисліпідемія та гіпертонія. Тому на основі цього можна судити про вплив високих концентрацій фруктози, в першу чергу, на роботу серцево-судинної системи [39]. За нормальних умов головною функцією нирок є фільтрація крові. Крізь фільтраційні капсули нефронів на добу проходить близько 180 л крові [43], відповідно, стан серцево-судинної системи тісно пов'язаний із фізіологічними процесами в нирках.

Інсулінорезистентність прямо чи опосередковано впливає на роботу печінки, метаболічні процеси в скелетних м'язах, нирках, жировій тканині [36].

Нині відомо велика кількість механізмів розвитку інсулінорезистентності, індукованої фруктозою. Внаслідок збільшення концентрації вільних жирних кислот та триацилгліцеролів у гепатоцитах спостерігається посилення окисного стресу, що призводить до активації різних регуляторних білків, зокрема, гамма-коактиватора рецептора 1- α (PPAR 1- α), внаслідок чого розвивається інсулінорезистентність. Ще один механізм формування резистентності до інсуліну пов'язаний з підвищенням внутрішньоклітинних концентрацій сечової кислоти, оскільки зі збільшенням концентрацій фруктози у раціоні спостерігається розвиток гіперурикемії [34]. Гіперінсулінемія збільшує інтенсивність фільтрації та підвищує проникність судинної стінки аферентних та еферентних артеріол у фільтраційній капсулі [37]. Крім того, збільшення кількості інсуліну в крові призводить до активації симпатичної нервової системи, що в свою чергу підвищує тиск в мікроциркуляторному руслі нирок і сприяє гіперфільтрації. Через активацію рецепторів до інсуліну на поверхні ендотеліоцитів артеріол індукується синтез NO – регулятора інтенсивності вазоконстрикції, внаслідок чого зростає швидкість клубочкової фільтрації [40].

Висока кількість фруктози у первинному фільтраті призводить до розвитку локального запалення, підвищення реабсорбції іонів у проксимальних каналцях нефрону [41]. Комплекс усіх симптомів метаболічного синдрому сприяє появі гострого та хронічного захворювання нирок, а за наявності патологій інших органів – діабетичного ураження нирок.

Збільшення концентрації екзогенної фруктози призводить до ураження клітин проксимальних каналців нирок, збільшення їх просвіту та інтенсивного поділу епітеліоцитів каналців [41]. Збільшення експресія GLUT5 на поверхні клітинної мембрани пов'язано з активною реабсорбцією фруктози, проте синтез GLUT2, який відповідає за її виділення в кров, залишається без змін. Отже, можна зробити висновок, що більшість поглинутої фруктози перетворюється саме в клітинах проксимальних каналців нирок [42].

Одразу після потрапляння в епітеліоцит відбувається фосфорилування фруктози за допомогою ензиму фосфотруктокінази, що в довготривалій

перспективі призводить до зменшення запасів АТФ [42]. Проміжні продукти розпаду фруктози можуть виступати в ролі субстратів для синтезу глюкози у нирках, оскільки глюкозо-6-фосфатаза (ЕС 3.1.3.9) активно функціонує в клітинах звивистих канальців нефрону [43]. Приблизно 26% вільної глюкози синтезується в процесі глюконеогенезу у нирках та виділяється у кров за умов насичення. Під час голодування за рахунок синтезу глюкози *de novo* відбувається підтримання сталої концентрації глюкози у нирках на рівні 46% [43].

Відомо, що поява гіпертонії при вживанні високосахарозної дієти пов'язана з посиленням реабсорбції Na^+ у проксимальних канальцях нирок. Встановлено, що за умов накопичення фруктози активується ренін-ангіотензинова система, яка відповідає за синтез ангіотензину II – регулятора реабсорбції Натрію. Наслідком метаболізму великої кількості фруктози у нирках є утворення в епітеліоциті диацилгліцеролу – активатора протеїнкінази С. Відповідно, кількість синтезованого ангіотензину II, який є необхідним для активації реабсорбції Na^+ , знижується, оскільки чутливість клітин до ангіотензину збільшується [44].

Отже, достатня забезпеченість раціону вуглеводами є необхідною умовою для підтримання сталого рівня енергії в клітині, проте збільшення частки сахарози в раціоні понад встановлену норму призводить до розвитку метаболічних розладів різного характеру, які в подальшому стануть основою для незворотних змін в структурі та функціонуванні систем органів.

1.3. Роль аденілових нуклеотидів у нирках за фізіологічних та патологічних умов

Аденілові нуклеотиди виконують низку функцій як в середині клітини, так і поза її межами, виступають незмінними регуляторами метаболічних процесів у нирках та інших системах органів. Найчастіше нуклеотиди та їх фосфатні ефіри відіграють роль сигнальних молекул. У формуванні пуриногенних сигналів беруть участь АТФ, АДФ, АМФ, аденозин та аденін.

Вони слугують месенджерами для передачі внутрішньоклітинних сигналів за фізіологічних та патологічних умов, відіграють роль у процесах реалізації нервового імпульсу, ендокринній та екзокринній секреції, скороченні м'язів, метаболізмі кісткової тканини, модулюванні клітинного поділу, формуванні локальної імунної відповіді, тощо [45].

Внутрішньоклітинна АТФ – основне джерело енергії для забезпечення процесів анаболізму в біологічних системах, є маркером життєздатності клітин, тому його концентрація у клітині в тисячі разів перевищує концентрацію в міжклітинному просторі. Зовнішньоклітинна концентрація АТФ досягає близько 5-20 μM , проте вона може коливатись в залежності від стимулів та дії подразників різної природи [46].

Молекула АТФ не здатна до транспортування крізь цитоплазматичну мембрану клітини способом простої дифузії, оскільки володіє негативним зарядом. За даними літератури [46] транспорт АТФ крізь мембрану забезпечують білки родини ABC, CFTR (від англ. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) та коннексинові канали, які, окрім АТФ, транспортують ще іони Ca^{2+} , Na^{+} та цАМФ, що вказує на важливість їх роботи для міжклітинної комунікації. Крім того, під час розвитку запалення концентрація АТФ у інтрацелюлярному просторі може різко підвищуватись за рахунок виділення аденозинтрифосфату із апоптичних та некротичних клітин, клітинами імунної системи.

Основним джерелом АТФ у позаклітинному середовищі нирок є нервові закінчення при стимуляції симпатичних нервових волокон, тромбоцити, мастоцити та ендотеліальні клітини кровоносних судин. Крім того, аденілові нуклеотиди можуть виділятися власне епітеліоцитами у відповідь на зміну об'єму клітин проксимальних, дистальних каналців та збірних трубочок, а також у відповідь на зміни мікросередовища у люмені вказаних ниркових структур [47].

Після виходу з клітини АТФ активує відповідні мембранні рецептори, що забезпечує формування та передачу сигналів. Крім того, АТФ ензиматично

перетворюється до інших сигнальних молекул: АДФ, АМФ, циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ) та кінцевого аденозину чи інозину. У нирках основною сигнальною молекулою є саме аденозин, оскільки три-, ди- та мононуклеотиди швидко дефосфорилюються за дії гідролаз, які розташовані ззовні на плазматичній мембрані. Перетворення АТФ до аденозину відбувається за допомогою нуклеозидтрифосфатдифосфорилаз (CD39, eNTPD), які каталізують реакцію дефосфорилювання АТФ до АДФ та АДФ до АМФ. Існує 3 типи eNTPD, проте саме eNTPD3 експресується найінтенсивніше у нирках. Ектонуклеотидпірофосфатаза або фосфодіестераза (eNPPD, EC 3.6.1.9) – ензим, який каталізує перетворення АТФ до АМФ, проте, на відміну від eNTPD продуктом реакції є пірофосфат (PPi). Дефосфорилювання АМФ до аденозину каталізує 5'-ектонуклеотидаза (CD73, EC 3.1.3.5) – олігопротеїн, який у великій кількості експресується на поверхні клітин всіх органів та відіграє роль у регуляції пуринергічної рецепції. Ще один ензим, який додатково забезпечує дефосфорилювання аденозинтри- та дифосфатів – лужна фосфатаза (EC 3.1.3.1) [48].

Відомо, що АТФ є молекулярним патерном, асоційованим із пошкодженнями (DAMP) та ініціює активацію передачі внутрішньоклітинного сигналу. Тому АТФ бере участь у підтриманні водного балансу, регуляції іонного гомеостазу, процесах реабсорбції та секреції, модуляції тону судин нирок, гломерулярної функції. Негативним ефектом зовнішньоклітинного АТФ є його прозапальні властивості, роль у розвитку гіпертензії, діабетичної нефропатії, гострого ниркового ураження, фіброзу, а також ускладнень, які виникають внаслідок прогресії метаболічного синдрому [49].

Ефект АТФ полягає у зв'язуванні із пуринергічними рецепторами на поверхні клітин усіх відділів нефрону, які активують каскад внутрішньоклітинної передачі сигналу. Родина P2 рецепторів поділяється на метаботропні P2Y₁₋₈ та іонотропні P2X₁₋₇, найбільша спорідненість яких спостерігається здебільшого саме до АТФ, менша – до АДФ та уридинфосфатів (УТФ, УДФ). В залежності від типу рецептору, що збуджується, запускається

відповідний сигнал, що призводить до клітинної відповіді на подразник. Крім того, існує відмінність між експресією P2 рецепторів вздовж нефрону. Наприклад, P2X рецептори не синтезуються подоцитами, проте лише цей тип рецепторів експресується на мембранах ендотеліоцитів аферентних артеріол, на мембранах епітеліоцитів дистальних звивистих каналців та висхідної частини петлі Генле. P2Y рецептори експресуються подоцитами, велика кількість присутня на мембранах клітин фільтраційної капсули, епітеліоцитів проксимальних каналців, клітинах збірних каналців [50].

АТФ безпосередньо регулює тонус судин мікроциркуляторного русла нирок, зв'язуючись із обома родинами P2-рецепторів: активація P2X призводить до вазоконстрикції, P2Y – вазодилатації артеріол. Ендотеліоцити артеріол, тромбоцити та еритроцити здатні виділяти достатні кількості АТФ в кровотік для релаксації стінок судин. Це досягається індукцією синтезу NO ендотеліальною синтазою оксиду азоту (eNOS, EC 1.14.13.39) в клітинах судинної стінки через активацію P2Y рецепторів [51]. Передача NO-сигналу до гладких м'язів судинної стінки запускає процес вазодилатації. Таким чином АТФ бере участь в регуляції артеріального тиску в еферентних та аферентних артеріолах нирок, що впливає на виконання органом однієї з найважливіших функцій – підтримання тиску крові.

Збільшення зовнішньоклітинної концентрації АТФ призводить до змін у цитоскелеті подоцитів, що збільшує проникність фільтраційної капсули для макромолекул. У проксимальному відділі каналців АТФ відіграє роль регулятора реабсорбції бікарбонатів. Механізм повторного всмоктування HCO_3^- пов'язаний із транспортом крізь апікальну мембрану протонів H^+ , що веде за собою зміни у концентрації Na^+ та функціонуванні протонної АТФ-ази. Активація P2Y активує протеїнкіназу C, що відіграє роль в інгібуванні NHE3 -каналів, створенні дисбалансу протонів та Na^+ безпосередньо зменшує інтенсивність всмоктування бікарбонатів. Роль АТФ у функціонуванні проксимальних каналців нефрону невелика [52]. Причиною є висока експресія лужної фосфатази та 5'-нуклеотидази, які перетворюють АТФ до аденозину. Це

слугує певним захисним механізмом, адже АТФ – прозапальний фактор і спричиняє інфільтрацію макрофагів, синтез прозапальних інтерлейкінів, TNF- α та утворення інфламасоми, що є однією із ланок розвитку гострого ураження нирок.

При активації P2Y рецепторів під впливом АТФ реєструються зміни в інтенсивності реабсорбції Na⁺ та Cl⁻ у низхідному відділі петлі Генле. Тут реабсорбується близько 40% NaCl, що впливає на об'єм епітеліоцитів каналця. Механізм регуляції реабсорбції Натрію у цьому відділі нефрону полягає у здатності АТФ активізувати ензиматичний синтез внутрішньоклітинних месенджерів, зокрема NO^{*}, що призводить до активації Na⁺-каналів [53].

У літературі доведено [54], що коливання перфузійного тиску в люмені призводить до вивільнення АТФ з епітеліоцитів, що у свою чергу регулює реабсорбцію Ca²⁺ через зв'язування з P2Y рецепторами. У низхідному відділі петлі Генле всмоктується приблизно 25% всього Кальцію із фільтрату за парацелюлярним та трансцелюлярним механізмами. Парацелюлярний спосіб тісно пов'язаний із реабсорбцією Натрію за допомогою Na⁺/K⁺/2Cl⁻-котранспортера (NKCC2). Крізь нього проходить у люмен K⁺, генеруючи таким чином різницю потенціалів. Завдяки утворенню трансмембранного потенціалу Кальцій переноситься з люмену в інтерстиціальний простір. Механізм регуляції внутрішньоклітинної концентрації одночасно трьох йонів за умов зв'язування нуклеотидів з P2Y рецепторами полягає в інгібуванні активності котранспортера йонів, завдяки чому двовалентні іони повторно не всмоктуються.

Активация P2Y рецепторів на поверхні клітин збірних трубочок сприяє підтриманню водного балансу. За умов набрякання клітини відбувається посилене виділення АТФ крізь аніонні канали, що запускає каскад клітинних сигналів для стабілізації клітинного об'єму, наприклад, сигнал про активацію об'єм-залежних K⁺-каналів (*volume-regulatory K⁺ channels*) [55]. Саме зміна осмотичного тиску за рахунок коливання концентрацій йонів по обидва боки клітинної мембрани сприяє секреції надлишкової води в люмен з подальшим

виведенням. З іншого боку, АТФ інгібує синтез цАМФ через PLC/Ca²⁺/PKC шлях при передачі сигналу від антидіуретичного гормону, результатом чого є безпосереднє збільшення діурезу.

АТФ бере участь у забезпеченні тубулогломерулярного зворотнього зв'язку (з англ. *tubuloglomerular feedback, TGF*) між епітеліоцитами та гладкими м'якими судинами нирок. У кінцевому відділі збірного каналця *macula densa* відбувається різкий викид АТФ у інтерстиціальний простір, що є відповіддю на підвищену концентрацію NaCl у люмені дистальних каналців [56]. АТФ зв'язується із P2X рецепторами, ініціюючи сигнал про вазоконстрикцію аферентних артеріол. Таким чином відбувається регуляція фільтраційного тиску окремого нефрону, що дозволяє ізотонічній кількості NaCl потрапляти до дистальних каналців, внаслідок чого відбувається стабілізація тиску крові у системі мікроциркуляції нирок.

Нуклеотиди, зокрема АТФ, можуть регулювати проліферацію та диференціацію ниркових фібробластів, впливаючи на їх трансформацію у міофібробласти. АТФ сприяє росту клубочкових мезенгіальних клітин, а в присутності інших факторів росту проявляє підсилюючий ефект на клітинний поділ. Механізм полягає в запуску сигнального шляху Ras/Raf/MAPK через активацію P2Y рецепторів [57]. АТФ міститься також у середині везикул місцевих нейтрофілів та тканинних базофілів і може виділятися назовні. АТФ як прозапальний фактор відіграє роль у ініціації та розвитку імунної відповіді, продукції АФК нейтрофілами та цитокінів IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18 іншими видами імунних клітин. Відомо, що АТФ є хемоатрактантом для нейтрофілів та CD4⁺ та CD8⁺ клітин. Зовнішньоклітинна концентрація АТФ близько 100–300 μ M стимулює мітоген-індуковану проліферацію та диференціацію Т-клітин через активацію P2Y-рецепторів [58].

Активація P2Y рецепторів за дії АТФ призводить до посилення гліюконеогенезу у гепатоцитах та нирках. Це відбувається за допомогою запуску P2Y₁₃/cAMP/PKA/CREB сигнального шляху, що в кінцевому результаті посилює синтез ензимів гліюконеогенезу. Крім того, збільшена

позаклітинна концентрація АДФ стимулює виділення глюкагону з α -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози, що вказує на роль аденозиндифосфату в якості посередника у регуляції рівня глюкози в крові [59].

Як показано у літературі [60] позаклітинний АДФ сприяє агрегації тромбоцитів в місцях пошкодження судин нирок, що дає початок утворенню тромбів та розвитку локального запального процесу. Викид АДФ у міжклітинне середовище відбувається як за умов клітинної загибелі, так і активується під впливом тромбіну. Збільшення концентрації АДФ запускає вивільнення ще більшої кількості динуклеотиду із внутрішньотромбоцитарного пулу. Це сприяє наростанню тромбоцитарної пробки та посиленій міграції тромбоцитів до місця запалення. За фізіологічних умов цей процес гальмується шляхом швидкого ензиматичного перетворення прозапальних АТФ та АДФ до протизапальних АМФ чи аденозину за допомогою ектонуклеозидтрифосфатдифосфорилази 1 (CD39, EC 3.6.1.5).

Дослідження показують позитивні властивості монофосфату для нирок за умов ішемічно-реперфузійного пошкодження (ІРП). Доведено, що АМФ та аденозин слугують лігандами для A_{2B} рецепторів, експресія яких значно підвищується за умов ІРП. Одночасне підвищення концентрації зовнішньоклітинних активаторів та синтезу A_{2B} рецепторів на поверхні клітини призводить до зниження деструктивного впливу ІРП, оскільки збільшує швидкість транспорту Ca^{2+} крізь мембрану в інтрацелюлярний простір для запобігання розвитку апоптозу клітин органу, ураженого ішемією [61].

Аденозин – важлива сигнальна молекула в регуляції метаболізму клітин нирок. Він слугує лігандом для родини рецепторів А, які широко розповсюджені вздовж нефрону. Активація А рецепторів запускає сигнальні процеси, кінцеві результати яких є контраверсивними до ефектів активації рецепторів P_2 . Тобто, в залежності від потреби та умов мікросередовища, зовнішньоклітинні аденілові нуклеотиди можуть взаємотрансформуватись для регулювання процесів в органах з протилежних сторін [62].

Основними сигнальними шляхами для А рецепторів є активація аденілатциклази (ЕС 4.6.1.1), фосфоліпази С (ЕС 3.1.4.3) та мітоген-активованих протеїнкіназ (*MAPK*, ЕС 2.7.11.24). Відомим є протилежний вплив аденозину на метаболічні процеси в нирках, що залежить від типу рецептору, з яким зв'язується нуклеозид. Активація A_{2A} та A_{2B} рецепторів чинить стимулюючий ефект на синтез цАМФ аденілатциклазою, активація A_1 та A_3 рецепторів інгібує активність аденілатциклази.

Аденозин, який виділяється клітинами *maculadensa*, може спричиняти вазоконстрикцію приносячої артеріоли нефрону через A_1 рецептори, регулюючи таким чином фільтраційний тиск. Проте судинна сітка нирок є гетерогенною, тому існують дослідження про те, що активація A_{2A} рецепторів на поверхні ендотеліоцитів супроводжується, навпаки, вазодилатацію великих ниркових артерій, юкстамедулярних аферентних артеріол, еферентних артеріол та медулярних судин [63]. A_{2A} та A_{2B} рецептори наявні на поверхні тромбоцитів і під час зв'язування з аденозином відбувається стимуляція аденілатциклази, синтез внутрішньоклітинного цАМФ, що призводить до інгібування агрегації тромбоцитів, чинить антитромбозний ефект, на відміну від АТФ [64]. Активація A_{2A} рецепторів на мембрані подоцитів пов'язана із регенерацією цілісності фільтраційного бар'єру за рахунок збільшення синтезу компонентів цитоскелету подоцитів [65]. Крім того, на те, що аденозин має захисний ефект для подоцитів за умов гіперглікемії, вказує інгібування його транспортерів ENT1 та ENT2 збільшеною концентрацією глюкози у крові.

За умов надлишкового споживання солі, гіпертензії та підвищеного рівня ангіотензину II спостерігається посилена реабсорбція Na^+ у проксимальних каналцях нирок, інгібування всмоктування бікарбонатів та затримка рідини в організмі під впливом активації A_1 рецепторів, що є негативним ефектом [66]. Активація A_1 рецепторів стимулює реабсорбцію глюкози, яка пов'язана із реабсорбцією Na^+ за умов розвитку метаболічного синдрому через SGLT-транспортери. Відомо, що тривала гіперглікемія та глюкозурія є ознаками розвитку діабетичних ускладнень. Зокрема, в літературі показано, що за умов

діабетичної нефропатії змінюється інтенсивність експресії не тільки SGLT-транспортерів, але і А рецепторів: у кортикальному шарі спостерігається збільшена експресія А1 та А3 рецепторів і, навпаки, зменшена експресія А2_А та А2_В рецепторів [67]. Інгібування активності SGLT транспортерів за умов діабету повертає аденозину його здатність регулювати фільтраційний тиск у капсулі, оскільки нереабсорбований Na⁺ стимулює синтез аденозину у ділянці *macula densa*, а профільтрована глюкоза виводиться з організму із сечею [68].

Аденозин активує всмоктування Na⁺ у висхідному коліні петлі Генле, інгібує реабсорбцію Cl⁻ та секрецію H⁺/HCO₃⁻ крізь ClC-K2/b-транспортери у мембрані інтеркалярних клітин збірних трубок, що загрожує розвитком алкалозу, гіпохлоремії та гіпотензією. Крім того, порушується базолатеральна електропровідність клітин збірних трубочок [69].

Доведеними є антизапальні властивості при активації А1, А2_А та А2_В рецепторів, що проявляється у зменшенні синтезу хемокінів та цитокінів місцевими імунними клітинами, редукції інфільтрації лейкоцитів, макрофагів та нейтрофілів. Активація А3 рецепторів призводить до оберненого ефекту – некрозу та посилення запальних процесів у нирках через індукцію вивільнення протеолітичних ензимів та гістаміну з гранул мастоцитів, тому експресія цих рецепторів обмежена лише поверхнею ендотеліальних клітин кровоносних судин нирок [70].

Отже, аденілові нуклеотиди формують одну із найбільших груп сигнальних молекул, які регулюють більшу частину процесів у нирках. Відповідно до того, який нуклеотид синтезується, спостерігаються різні клітинні відповіді вздовж нефрону. Це вказує на важливість функціонування коректної аденілової взаємодії між клітинами за фізіологічних та патологічних умов.

1.4. Характеристика ензимів пуринового циклу та шляхи регуляції їх активності

Пуринові нуклеотиди є есенціально важливими для забезпечення життєздатності клітини, оскільки формують та підтримують енергетичний гомеостаз. Внутрішньоклітинний АТФ – основний макроерг, розщеплення якого робить можливим власне процес синтезу речовин. Крім того, аденілові нуклеотиди відіграють роль у реплікації та репарації ДНК, входять до складу нікотинамідних та флавінових коферментів, коензиму А, тощо.

Підтримання внутрішньоклітинного пулу пуринових нуклеотидів досягається шляхом симбіозу трьох основних метаболічних шляхів: синтезу *de novo* (утворення АМФ та ГМФ), ресинтезу ди- і трифосфатів та деградацією залишкових нуклеозидів до кінцевих продуктів метаболізму. Ресинтез ди- та трифосфатів можливий або за участі аденілаткінази (ЕС 2.7.4.3) та гуанілаткінази (ЕС 2.7.4.8), або відбувається в процесах окиснювального та субстратного фосфорилування. Ці процеси взаємопов'язані та взаєморегульовані, що дозволяє забезпечувати підтримання балансу між анаболізмом та катаболізмом пуринів.

Синтез пуринів *de novo* – висококонсервативний, складний та енергозатратний процес [71]. 6 ферментів, які забезпечують 10 стадій утворення пуринів, складають динамічну мультиферментну систему – пуриносому. Система працює за принципом ченелінгу субстрату від активного центру одного ензиму до іншого, що збільшує швидкість, ефективність та продуктивність синтезу. Оскільки концентрація вільних нуклеотидів у клітині є низькою (окрім АТФ), функціонування мультиферментної системи, ймовірно, забезпечує оптимізацію репарації та реплікації ДНК. Основним субстратом для синтезу пуринів *de novo* є рибозо-5-фосфат, а кінцевим продуктом – інозинмонофосфат (ІМФ). Цікавим є те, що донором фосфатних груп у двох останніх реакціях утворення АМФ є гуанозинтрифосфат, таким чином утворені кінцеві нуклеозидфосфати не витрачаються на забезпечення власного синтезу, а відбувається взаємозаміщення донора енергії.

Більша частина пуринових основ, які вивільняються після відщеплення фосфатів у метаболічних процесах, не деградує до кінцевих продуктів метаболізму і не виділяється з клітини, а реутилізується. Доведено, що в нормі майже 90% гіпоксантину перетворюється знову до ІМФ і цикл синтезу пуринових нуклеотидів замикається. Процес перетворення аденіну до АМФ відбувається за дії одного ферменту – аденозинфосфорибозилтрансферази (ЕС 2.4.2.7) і не потребує значних затрат енергії у порівнянні із синтезом *de novo*. Ресинтез нуклеотидів виражений у всіх клітинах організму, проте найбільше значення має для життєздатності клітин, які не здатні самостійно синтезувати пурини *de novo* чи експресія ензимів такого синтезу є недостатньою. Такими клітинами є, наприклад, нейрони та еритроцити [72].

Ключовим ензимом синтезу АТФ у процесі окиснювального фосфорилування є F_0F_1 -АТФ-аза (ЕС 7.1.2.2), яка розташована на внутрішній мембрані мітохондрій. Ензим має здатність генерувати АТФ з АДФ та Фн, застосовуючи в якості енергетичного субстрату електрохімічний градієнт протонів H^+ по обидва боки внутрішньої мітохондріальної мембрани. Проте, окрім своєї синтазної функції, ензим каталізує протилежну реакцію – гідролізу АТФ до АДФ та Фн, таким чином стимулюючи транспорт протонів у міжмембранний простір з подальшою поляризацією мембрани. Відомо, що АТФ-аза складається з 2 субодиниць: трансмембранної гідрофобної F_0 , яка виконує функції транслокази протонів H^+ , та F_1 – каталітичної гідрофільної субодиниці, яка обернена у матрикс мітохондрій. Саме вона забезпечує як синтез, так і гідроліз АТФ [73].

Існує два стани, коли гідролазна функція АТФ-ази буде переважати: коли концентрація АТФ буде вищою, ніж різниця протонного градієнту, який забезпечує ензим енергією, або ж протонний градієнт не формуватиметься, а іони з міжмембранного простору розсіюватимуться, як і відбувається за умов ішемії. Доведено, що гідролазна активність забезпечується таким самим принципом каталізу, як і синтазна, тільки повертання ротора здійснюється в іншу сторону. Еволюційно така функція АТФ-ази з'явилась лише в еукаріотів.

АТФ-азна активність регулюється у відповідь на коливання енергетичного балансу клітини. Провідну роль у цьому відіграє модулювання активності ензимів ЕТЛ, внутрішньоклітинна концентрація енергетичних субстратів, нековалентні та ковалентні модифікації протеїну, тощо. Відомим інгібітором гідролазної активності АТФ-ази є невеликий протеїн IF1, який активується за умов ішемії, коли енергетичні затрати клітини зростають без відновлення постачання субстратів для окислення. Зменшення активності ензиму під впливом IF1 дозволяє знизити кількість споживання АТФ пошкодженими мітохондріями і запобігає його деградації власне синтазами [74].

Доведено, що збільшення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} є одним із основних активаторів АТФ-азної активності. Під впливом інтенсивного потоку Ca^{2+} активуються Ca^{2+} -залежні переносники, які забезпечують формування мітохондріального пулу іону, що призводить до підвищення активності мітохондріальних дегідрогеназ і, відповідно, АТФ-синтази. Крім того, Mg^{2+} , який виступає природнім кофактором АТФ-ази, може за деяких умов замінюватись Ca^{2+} , що активує гідролазну активність ензиму [75]. Також дослідження показують інгібуючий вплив на АТФ-азу інтермедіату циклу трикарбонових кислот α -кетоглутарату та його похідного 2-гідроксиглутарату [76].

Ковалентні модифікації окремих амінокислот можуть впливати на активність АТФ-ази шляхом її інактивації. Наприклад, нітрування тирозинових залишків у 345 та 368 положеннях у складі β -субодиниці сприяє пригніченню як синтазної, так і гідролазної активностей. Цікавим є те, що фосфорилування 262 залишку треоніну під час синтезу ензиму призводить до порушень у його збірці, що, відповідно, робить його нефункціональним [76].

Нещодавні дослідження доводять [77], що АТФ-аза може використовувати у якості додаткового джерела енергії електрохімічний градієнт K^+ , проте перевага належить саме протонному градієнту. Експериментально було показано, що очищена та перенесена у протеоліпосомі АТФ-аза може синтезувати АТФ, використовуючи електрохімічний градієнт K^+ .

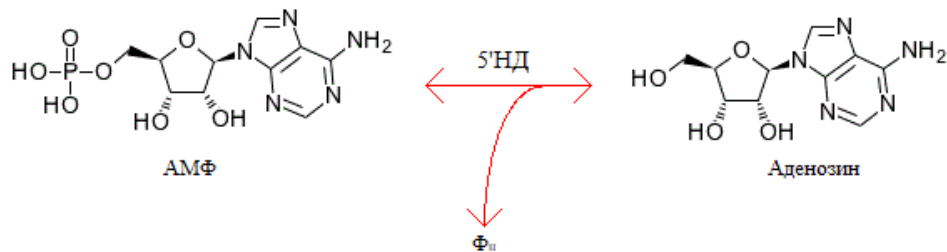
Підраховано, що замість одного протону АТФ-аза споживає енергію 3,5 катіонів за умов наявності фізіологічних концентрацій обох іонів.

АМФ-деаміназа (АМФД, ЕС 3.5.4.17) – лімітуючий ензим катаболізму аденозинмонофосфату, який каталізує перетворення АМФ до ІМФ з виділенням вільного аміаку. Його активність детермінує інтенсивність подальшого розпаду пурину, регулюючи таким чином внутрішньоклітинну концентрацію аденілових нуклеотидів. Існує три ізоформи цього ензиму: АМФД1, яка експресується у м'язах, АМФД2 – печінкова форма та АМФД 3 – еритроцитарна, проте синтезується також і в інших органах, зокрема у нирках. Активується АМФД за умов інтенсивних енергетичних затрат, коли співвідношення АТФ/АДФ знижується. АМФД інтегрує синтез обох пуринів – гуаніну та аденозину, дозволяючи модуляцію синтезу одного пурину за умов енергетичного забезпечення іншим, оскільки їх спільним попередником є ІМФ. АМФД – цитозольний ензим, проте нові дослідження [78] вказують на його імовірну експресію на поверхні клітин лейкоцитів, що робить АМФД ще одним регуляторним ензимом передачі пуринергічного сигналу.

АМФ-деаміназа – негативний регулятор внутрішньоклітинного вмісту АМФ – основного активатора АМФ-залежної протеїнкінази (ЕС 2.7.11.1). Цей ензим слугує метаболічним регулятором та активується відповідно при збільшенні кількості АМФ, тобто, при інтенсивній деградації внутрішньоклітинних фосфатів [79]. Стимулом для активації протеїнкінази може бути нестача глюкози, важкі фізичні навантаження, гіпоксія та ішемія. За умов активації протеїнкінази в середині клітини зупиняються процеси анаболізму і, навпаки, переважають катаболічні реакції, які повинні забезпечити більшу кількість АТФ. Доведено, що за умов активації АМФ-залежної протеїнкінази знижується інтенсивність реабсорбції Na^+ шляхом інгібування активностей ENaC -каналів проксимальних каналіах нирок та NKCC2 -котранспортерів у збірних трубочках, оскільки це основний процес, який потребує значного енергетичного забезпечення [80]. Питанням залишається модуляція протеїнкіназою активності Na^+/K^+ -АТФ-ази вздовж

нефрону, тому що з одного боку дослідження показують інгібуючий вплив на активність ензиму у легенях, з іншого – відсутність будь-якого впливу на Na^+/K^+ -АТФ-азу міоцитів.

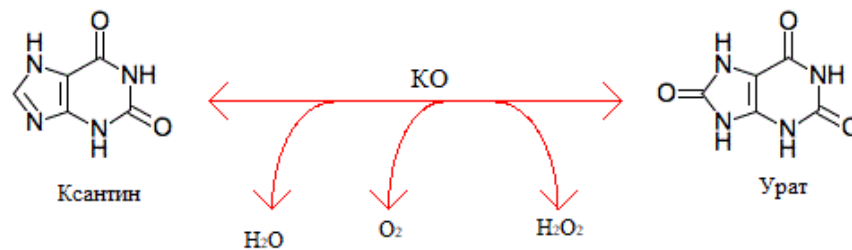
Окрім перетворення у АМФ-деаміназній реакції до ІМФ, АМФ може дефосфорилуватись за допомогою 5'-нуклеотидази (5'НД, ЕС 3.1.3.5) до аденозину. Цей ензим каталізує відщеплення фосфатів від нуклеотидів, утворюючи нуклеозиди, і володіє широкою специфічністю щодо субстратів.



В організмі людини поширені три основні ізоформи 5'-нуклеотидази, дві з яких цитозольні і одна знаходиться у ліпідному бішарі мембрани (екто 5'-нуклеотидаза). Цитозольна 5'-нуклеотидаза I експресується лише у м'язах, 5'-нуклеотидаза II – у всіх інших клітинах організму [81]. Активність ензиму зростає під час посиленого використання клітиною енергії АТФ, оскільки він забезпечує гідроліз ІМФ до інозину, що є одним із етапів деградації надлишкових нуклеотидів. Зменшення активності 5'НД у міоцитах скелетних м'язів призводить до посилення фосфорилування АМФПК, що індукувало додатковий транспорт глюкози в середину клітини. Тобто, дослідження показують, що 5'НД на рівні з АМФД є регуляторами активності АМФПК, проте спорідненість АМФ з АМФД є вищою. Проте 5'НД – ензим, чутливий до окиснювального стресу. У літературі показано [82], що алопуринол – інгібітор ксантиноксидази – призводить до підвищення рівня аденозину, синтезованого нуклеотидазою, що свідчить про інгібування ензиму супероксиданіоном ($\text{O}_2^{\cdot-}$). В той же час аденозин та інозин можуть виступати активаторами ензимів антиоксидантної системи, зокрема SOD, SIRT, I κ B- α та iNOS.

Продукт 5'-нуклеотидазної реакції – аденозин – регулятор активності аденілатциклази та концентрації цАМФ як посередника внутрішньоклітинних сигналів, а також виступає у ролі інгібітора фосфодіестерази [83]. Якщо внутрішньоклітинна концентрація аденозину підвищується, молекула може транспортуватись у міжклітинний простір крізь білки у мембрані: hCNT1-3 та hENT1-4. За умов низьких концентрацій аденозину він фосфорилується аденілаткіназою (EC2.7.4.3) до АМФ. Це не дає молекулі змоги покинути клітину, оскільки основною рушійною силою для транспорту аденозину крізь мембрану є градієнт концентрації.

Останнім ензимом у ланцюзі деградації пуринових нуклеотидів є ксантиноксидоредуктаза (EC1.17.3.2) – ензим, який каталізує перетворення гіпоксантину до ксантину та подальше утворення з нього сечової кислоти.



Побічним продуктом цієї реакції є пероксид водню, тому ксантиноксидазу вважають одним із основних сайтів утворення АФК, а при підвищенні її активності спостерігається розвиток окисного стресу. Проте утворення АФК, особливо пероксиду водню, у невеликій кількості має позитивний ефект для деяких клітин, тому що H₂O₂ виступає посередником у передачі деяких внутрішньоклітинних сигналів про експресію необхідних білків. Кінцевий продукт ксантиноксидазної реакції, сечова кислота, може слугувати маркером протікання таких порушень обміну речовин як метаболічний синдром, дисліпідемія, інсулінорезистентність, ожиріння, тощо. Наприклад, одним із симптомів метаболічного синдрому є гіперурикемія – збільшене утворення сечової кислоти, яка є кінцевим продуктом деградації пуринів. Всі ці факти свідчать про важливість подальших досліджень

активності ксантиноксидази та способів її регуляції за різних патологічних станів.

Ксантиноксидаза (КО) має дві ізоформи: дегідрогеназну та редуктазну. Це великий димерний білок з молекулярною масою близько 270 кДа. До складу кожної із субодиниць входить 2 атоми молібдену, 2 залізо-сірчані (Fe-S) кластери та FAD. Субодиниці відрізняються акцептором електронів – для ксантиндегідрогеназної субодиниці – це NAD^+ , для ксантиноксидазної – молекулярний кисень. Дегідрогеназна форма може перетворюватись у оксидазну шляхом часткового протеолізу або оборотного сульфогідрильного окислення [84].

Основні та побічні продукти ксантиноксидазної реакції є прозапальними агентами, їх надмірне накопичення призводить до розвитку локального запального процесу в нирках. Дослідження показують позитивний ефект інгібіторів КО на протікання діабетичного ниркового ураження на ранніх стадіях захворювання. У нирках КО може перебувати у двох ізоформах, проте переважає саме оксидазна форма, при цьому за умов розвитку діабетичного захворювання нирок швидкість перетворення дегідрогеназної форми у оксидазну зростає [85]. Збільшені концентрації продукту ксантиноксидазної реакції підвищують реабсорбцію іонів Натрію у проксимальних каналцях нирок, що призводить до затримки води в організмі. Крім того, сечова кислота – активатор мітоген-залежних протеїнкіназ у гладких м'язцях судинної стінки, що призводить до індукції окисного стресу та порушення еластичності судин. Ці фактори відіграють роль у розвитку гіпертензії, що безпосередньо впливає на швидкість фільтрації в нирках.

Порушення активності ферментів, що забезпечують функціонування пуринового циклу, призводить до накопичення дефектних ферментів в клітинах та біологічних рідин. Надлишок цих субстратів може чинити безпосередній токсичний ефект на певні типи клітин, надлишок неперетвореного субстрату також може брати участь в інших метаболічних шляхах з утворенням токсичних продуктів.

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти та методи досліджень

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 130-140 г, віком 2,5-3 місяці. Всі дії з тваринами проводили відповідно до вимог Міжнародної конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших цілей.

Модель експерименту передбачала поділ тварин на 4 наступні групи:

“I група – щури, які отримували повноцінну напівсинтетичну дієту (К);

II група – щури, які перебували на напівсинтетичній низькопротеїновій дієті (НПР);

III група – щури, які отримували високосахарозний раціон (ВС);

IV група – щури, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон (НПР/ВС)”.

Тварини отримували щоденно по 30 г дієти, з 7 та 15 днів експерименту кількість дієти було зменшено до 24 та 21 г/на добу відповідно. “До складу напівсинтетичної дієти входили: крохмаль – 620,7 г/кг, казеїн – 140,0 г/кг, сахароза – 100 г/кг, соєва олія – 40,0 г/кг, целюлоза – 50 г/кг, цистеїн – 1,8 г/кг, холін барбітурат – 2,5 г/ кг, мінеральна суміш – 35 г/кг (фосфорнокислий калій (KH_2PO_4) – 163,3 г/кг, вуглекислий кальцій (CaCO_3) – 160,2 г/кг, хлористий натрій (NaCl) – 58,5 г/кг, сірчаноокислий магній ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) – 24,1 г/кг, закисне залізо ($\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) – 11,1 г/кг, сірчаноокислий марганець ($\text{MnSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) – 1,87 г/кг, йодистий калій (KI) – 0,322 г/кг, сірчаноокислий цинк ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) – 0,23 г/кг, фтористий натрій (NaF) – 0,21 г/кг, сірчаноокисла мідь ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) – 0,2 г/кг, алюмокалієві квасці ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$) – 0,047 г/кг, хлористий кобальт ($\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) – 0,01 г/кг); вітамінна суміш – 10 г/кг (нікотинова кислота – 30,0 мг/кг, кальцій пантотенат – 15,0 мг/кг, піридоксин – 6,0 мг/кг, тіамін – 5,0 мг/кг, рибофлавін – 6,0 мг/кг, фолієва кислота – 2,0 мг/кг, біотин – 0,2 мг/кг, вітамін B12 – 960,0 мкг/кг, вітамін К – 960 мкг/кг, ретинол ацетату – 1,37 мг/кг, вітаміну Д – 0,025 мг/кг, вітамін Е – 50,3 мг/кг)”.

Виділення цитозольної фракції проводили із тканин нирок щурів. Буфер для гомогенізування нирок містив 0,03 М трис-НСІ (рН 7,4), 0,25 М сахарози та 0,001 М ЕДТА. Гомогенізацію нирок проводили за температури +4°C, після чого отриманий гомогенат центрифугували 10 хв при 1000 g. Супернатант відібрали і центрифугували 10 хв при 12000 g. До отриманої надосадової рідини додавали попередньо охолоджені MgCl₂ та CaCl₂ у співвідношенні 9:1. Розчин перемішували за допомогою автоматичної мішалки 10 хв, після чого центрифугували протягом 10 хв при 10000 g. Цитозольну фракцію використовували для досліджень активностей ензимів.

Виділення мітохондрій здійснювали методом диференційного центрифугування: після осадження ядерної фракції проводили осадження мітохондріальної фракції шляхом центрифугування протягом 10 хв при 12000 g, після чого тричі промивали буфером, який складався з 0,03М трис-НСІ (рН7,4), 0,25 М сахарози при 12000 g. Приготовану мітохондріальну суспензію розподіляли в об'ємі 0,5 мл у мікропробірки типу Еппендорф, після чого матеріал поміщали у морозильну камеру для руйнування мітохондріальних мембран. Мітохондріальний препарат в подальшому використовували для вимірювання концентрацій АТФ, АДФ та АМФ, а також для дослідження активності F₁F₀-АТФ-ази.

Визначення АМФ-деаміназної активності у цитозольній фракції

Принцип визначення АМФ-деаміназної активності у цитозольній фракції нирок ґрунтується на кількісному визначенні аміаку, який вивільняється при дезамінуванні АМФ. Кількість аміаку визначали за допомогою кольорової фенол-нітропрусид-гіпохлоридної реакції Бертло. Активність ензиму вимірювали фотоколориметрично при довжині хвилі 540 нм.

У дослідну пробірку вносили 1,5 мл інкубаційного середовища, яке містило 0,5 М MgCl₂, 1 М КСІ та фосфатний буфер, рН 7,4. Далі додавали 0,1 мл цитозольної фракції та 0,2 мл 24% розчину АМФ. У контрольну пробу додавали 1,5 мл інкубаційного середовища, 0,1 мл цитозолу та 0,2 мл

дистиляту. Після додавання всіх реагентів пробірки поміщали в термостат з t 37°C на 30 хв для утворення забарвленої реакційної суміші. Після інкубування всі пробірки центрифугували протягом 10 хв при 3000 об/хв та міряли на ФЕКу при 540 нм.

Кількість аміаку у пробах визначали за калібрувальним графіком, який формували за стандартним розчином сірчанокислого амонію. АМФ-деаміназну активність оцінювали за кількістю вивільненого аміаку і виражали в нмоль NH_3 за 1 хв на 1 мг протеїну. Вміст протеїну визначали методом Лоурі.

Визначення 5'-нуклеотидазної активності у цитозольній фракції

Активність 5'-нуклеотидази вимірювали за допомогою методу, в основі якого лежить гідроліз АМФ до аденозину та P_i . Кількість у пробі неорганічного фосфату визначали реакцією Фіске-Суббароу з молібденовим реактивом.

У дві пробірки для центрифугування вносили по 0,1 мл цитозольної фракції нирок щурів. В контрольну пробу додавали 0,6 мл буферно-субстратного розчину №1, який складався з 5 мг β -гліцерофосфату, розчиненого в 10 мл 0,2 М трис-буферу, рН 7,5. В дослідну пробу вміщували 0,6 мл буферно-субстратного розчину №2, який містив 10 мг АМФ розчиненого у 10 мл 0,2 М трис-буферу, рН 7,5. Проби інкубували у термостаті з t 37°C протягом 3 годин. Після інкубації в контрольну та дослідну пробірки додавали по 0,7 мл 10% ТХО та центрифугували 10 хв при 2500 об/хв. Вміст неорганічного фосфату визначали у надосадовій рідині.

Активність 5'-нуклеотидази виражали в нмоль P_i , що утворилася в результаті гідролізу АМФ за 1 хв на 1 мг протеїну.

Визначення кількості неорганічного фосфату в дослідних пробах методом Фіске-Суббароу

З дослідної пробірки відбирали 0,9 мл реакційної суміші і додавали 2,1 мл реактиву №3, який складався з 6 мл 0,42% молібдату амонію, розчиненого в 1н сірчаній кислоті та 1 мл 10% аскорбінової кислоти. Останню готують безпосередньо перед використанням. При взаємодії молібдат з неорганічним

фосфатом утворюється комплексна сполука, подальше відновлення якої супроводжується появою синього забарвлення у пробірці. Після цього проби інкубували протягом 30 хв при 37° С. Оптичну густина визначали спектрофотометрично за довжини хвилі 820 нм.

Концентрацію P_i у дослідних пробах визначали за калібрувальним графіком.

Визначення ксантиноксидазної активності в цитозольній фракції

Принцип методу визначення ферментативної активності ксантиноксидази базується на основі її здатності каталізувати перетворення ксантину до сечової кислоти. Про ферментативну активність ензиму судили за кількістю утвореної сечової кислоти і виражали в нмоль за 1 хв в перерахунку на 1 мг протеїну.

Для дослідження використано: 0,1 мл досліджуваного зразка та 0,7 мл буфера, який складався з 4 ммоль розчину ксантину в 0,01 моль/л NaOH і 0,2 мл 0,1 моль/л трис-HCl, 2 ммоль/л EDTA та 1 ммоль/л фенілметилсульфонілфториду. Далі отримані проби інкубували 60 хв при 40 °С. Для зупинки реакції до пробірок вносили 0,5 мл 20% розчину ТХО, після чого нейтралізували кислоту 0,5 мл насиченого розчину Na_2CO_3 . Після центрифугування протягом 10 хв при 1000g проби використовували для вимірювання вмісту сечової кислоти.

Визначення кількості сечової кислоти уніфікованим методом Фоліна

Принцип методу базується на здатності сечової кислоти в лужному середовищі відновлювати фосфорновольфрамний реактив до барвника синього кольору. Інтенсивність забарвлення реакційного розчину відповідає кількості сечової кислоти в пробі.

Проведення аналізу відбувалося за допомогою стандартного набору реактивів. До 0,5 мл досліджуваної проби додавали 4 мл дистилляту, 0,25 мл підкислювача і вольфрамата. Паралельно робили калібрувальну пробу з додаванням калібрувального розчину сечової кислоти з концентрацією 0,3

ммоль/л (300 мкмоль/л) та всіх реактивів, що додавали у дослідну пробу. Після того витримували 10 хв при кімнатній температурі і центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Надалі відбирали 1,5 мл центрифугату і калібрувальної проби, додаючи до них 0,75 мл карбонату натрію та 0,5 мл реактиву Фоліна. Проби витримували 30 хв при кімнатній температурі.

Вимірювали оптичну густину дослідної та калібрувальної проб проти холостої. Холоста проба містила 1,5 мл дистильованої води, 0,75 мл карбонату натрію та 0,5 мл реактиву Фоліна. Вимірювання оптичної густини проводили на фотоелектроколориметрі з довжиною хвилі 650 нм.

Визначення гідролазної активності F₁F₀-АТФ-ази у мітохондріальній фракції

В основі визначення гідролазної активності F₁F₀ АТФ-ази лежить здатність каталізувати реакцію відщеплення неорганічного фосфату від АТФ. Про гідролазну активність ензиму судили за кількістю вивільненого P_i, який визначали методом Фіске-Суббароу.

В 2 мл інкубаційного середовища, яке містило 400 мкмоль трис-НСІ, рН 7,4, 5 мкмоль АТФ, 7,5 мкмоль MgSO₄, 0,05 мкмоль динітрофенолу, 7,5 мкмоль СаСІ₂, 120 мкмоль NaСІ, 20 мкмоль КСІ, додавали 400 мкл суспензії мітохондрій. Проводили інкубування отриманих зразків 15 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 10% ТХО. Пробірки центрифугували при 3000 g впродовж 10 хв. В подальшому з отриманими зразками проводили реакцію з молібденовим реактивом для визначення вмісту неорганічного фосфату. Вміст Фн в дослідній пробірці вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 625 нм проти контрольної проби.

Активність АТФ-ази виражали в нмоль P_i/хв×мг протеїну.

Визначення вмісту АТФ, АДФ та АМФ у мітохондріальній фракції методом тонкошарової хроматографії

Вміст аденілових нуклеотидів у мітохондріальній фракції визначали методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Silufol». Принцип методу базується на просторовому розподілі АТФ, АДФ та АМФ залежно від індивідуальних характеристик разом з розчинником в шарі сорбенту.

Отримання безбілкового екстракту. Визначення проводили у безбілковому екстракті. Для отримання безбілкового екстракту до мітохондріальної фракції додавали 4% розчину HClO_3 з кінцевим співвідношенням 1:2. Розчин перед використанням охолоджували. Білок видаляли за допомогою центрифугування протягом 10 хв при 3000g. До отриманої надосадової речовини додавали пропорційну кількість 5н розчину КОН для нейтралізації кислоти і залишали на льоду на 1 год. Після цього утворений осад перхлорату калію видаляли центрифугуванням впродовж 15 хв при 3000g. Супернатант використовували для проведення тонкошарової хроматографії.

Метод тонкошарової хроматографії на пластинках Silufol. На попередньо підготовлену пластинку «SilufolUV-245» на відстань 2 см від нижнього краю наносили з інтервалом в 1-1,5 см стандартну суміш нуклеотидів (2 мг 0,01 М АТФ динатрієвої солі, 2 мг 0,01 М АДФ динатрієвої солі та 2 мг 0,01 М АМФ динатрієвої солі) та досліджувані зразки безбілкового екстракту. Розчини наносили невеликими краплями і одразу підсушували у холодному потоці повітря. Після нанесення всіх зразків пластинку поміщали в хроматографічну камеру так, щоб нижній край пластинки був на 1,5-2 см занурений у розчинник. Приготований розчинник містив ізопропанол, воду та аміак у співвідношенні 70 : 20 : 15. Перед проведенням хроматографії камеру насичували парами розчинника. Коли фронт розчинника підіймався за 3-4 мм до краю пластинки Silufol, її виймали та висушували під витяжною шафою у тоці холодного повітря. Розміщення нуклеотидів на хроматограмі визначали за допомогою ультрахемоскопа. Ділянки хроматограми, які поглинали

ультрафіолетову частину спектру, вирізали, стирали в пробірки Eppendorf та елюювали 0,1 н розчином HCl протягом 3 годин. Після цього пробірки центрифугували протягом 10 хв при 5000 об/хв. Оптичну густину в елюаті визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 260 нм.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «*Microsoft Excel*». Статистичну значимість різниці середніх показників оцінювали, використовуючи стандартний *t*-критерій Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності між групами при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомо, що продукування достатньої кількості АТФ у нирках є необхідною умовою для забезпечення клітинного анаболізму, проходження фізіологічних процесів, таких як реабсорбція та секреція з подальшим виділенням кінцевих продуктів метаболізму, регуляції водно-сольового та кислотно-лужного балансу, тощо [1]. Тому питання механізмів порушення енергетичної рівноваги, наслідком чого можуть стати зміни в проходженні основних фізіологічних процесів у нирках, за умов дисбалансу сахарози та харчового протеїну залишається відкритим.

Основу енергозабезпечення клітини складає система аденілових нуклеотидів, головною сполукою якої вважається АТФ – макроерг, який забезпечує проходження більшості ендотермічних реакцій в клітині [86]. АТФ разом із АДФ та АМФ складають систему аденілових нуклеотидів, співвідношення яких залежить від енергетичних потреб та витрат клітини: АМФ та АДФ є позитивними ефекторами, що стимулюють процеси катаболізму для синтезу АТФ і, навпаки, кількість та потреба в АТФ регулюватиме внутрішньоклітинну концентрацію АДФ та АМФ.

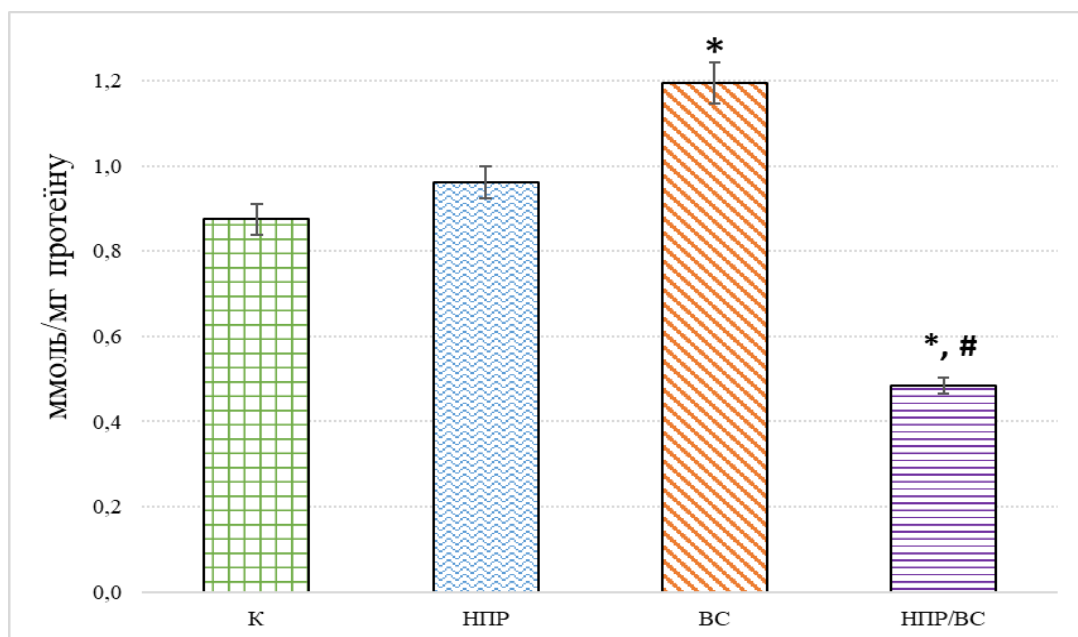


Рис. 1. Вміст АТФ у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Примітка (тут і надалі): К – щури, які отримували повноцінну напівсинтетичну дієту, НПР – тварини, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, ВС – група тварин, які перебували на високосахарозній дієті, НПР/ВС – щури, які отримували низькопротеїновий/високосахарозний раціон.

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

– статистично вірогідна різниця порівняно з групою ВС, $P \leq 0,05$

Результати проведених досліджень показали, що у мітохондріях нирок тварин, які перебували на низькопротеїновому раціоні, достовірних змін вмісту АТФ та АДФ не спостерігається (рис. 1, рис. 2).

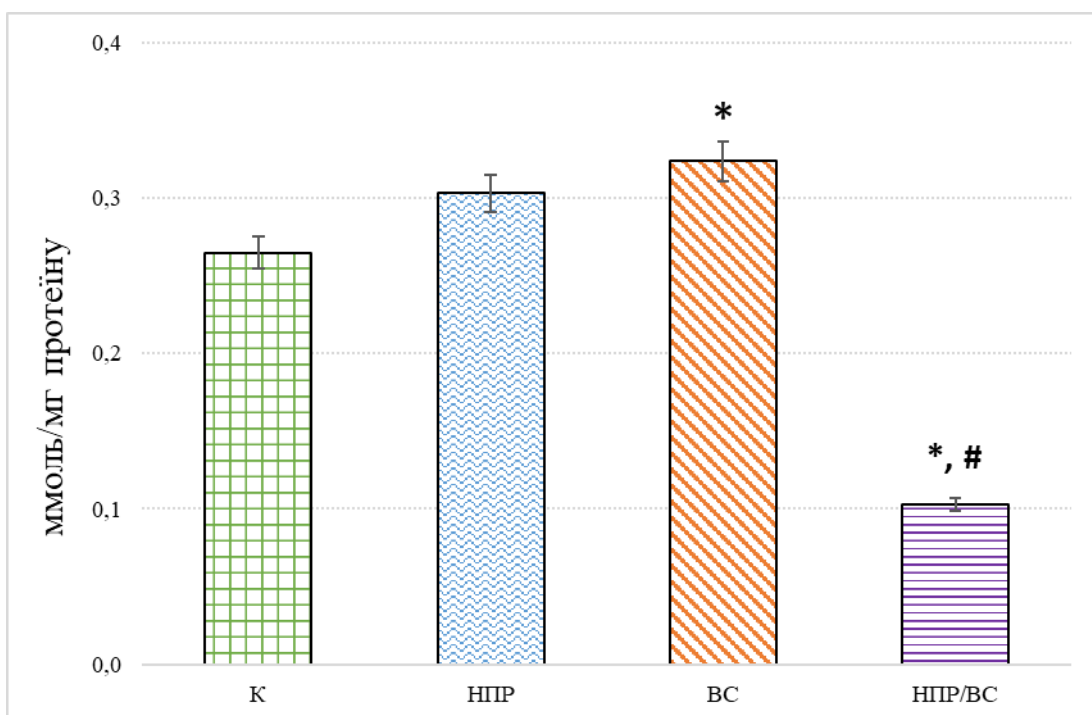


Рис. 2. Вміст АДФ у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Проте, у мітохондріальній фракції нирок вказаної групи тварин спостерігається зниження вмісту АМФ у понад 2 рази порівняно з показниками контрольної групи (рис. 3). Враховуючи, що АМФ є алостеричним активатором АМФ-залежної протеїнкінази (АМФК, ЕС 2. 7. 11. 31) – "метаболічного перемикача", який контролює інтенсифікацію катаболічних процесів з метою утворення енергії за гіпоенергетичних станів та, навпаки, пригнічення клітинного анаболізму, то наслідком зниження вмісту АМФ за досліджуваних умов буде зниження активності АМФ-залежної кінази [87]. Зниження

активності АМФК за умов дефіциту екзогенного білка та есенціальних амінокислот ймовірно, відіграє роль «захисного механізму», оскільки надмірна активація кінази сприяє катаболізму протеїнів та гальмує їх синтез через інгібування активності mTORC1 [88].

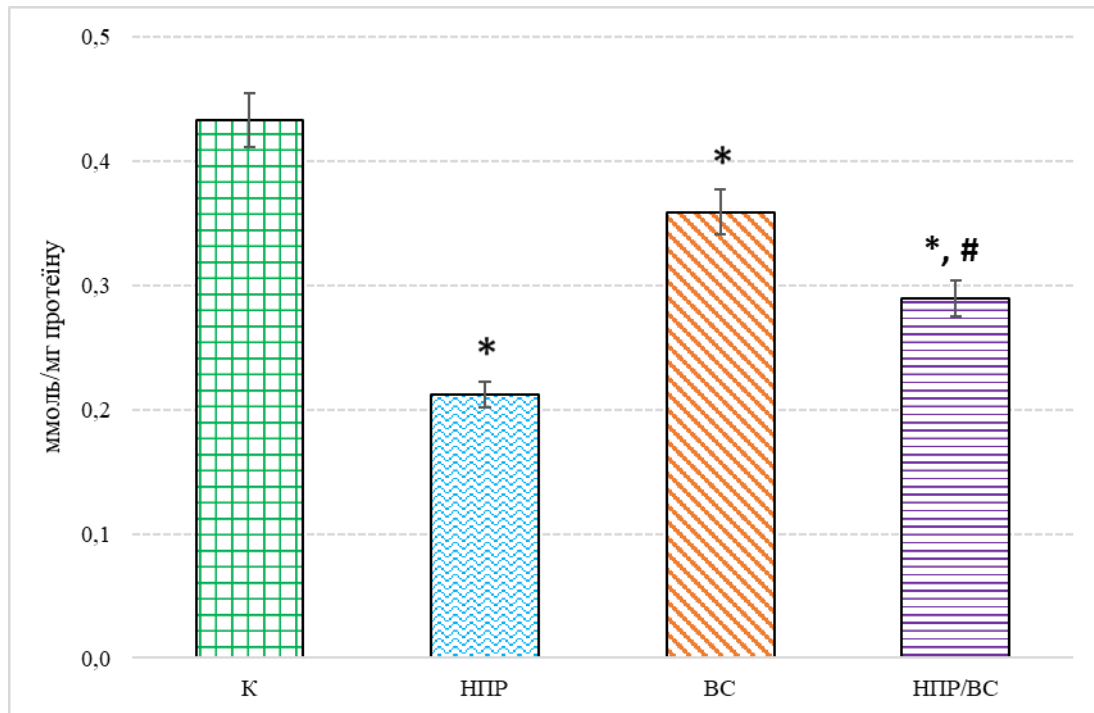


Рис. 3. Вміст АМФ у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Водночас, у мітохондріях нирок щурів, яких утримували на високосахарозному раціоні, реєстрували незначне збільшення концентрації АТФ (рис. 1) та АДФ (рис. 2) з одночасним зниженням вмісту АМФ (рис. 3). Ймовірно, за досліджуваних умов підвищення концентрації АТФ пов'язано із посиленням надходженням субстратів із током крові до нирок, оскільки для забезпечення реабсорбції глюкози у проксимальних канальцях нирок потреба у АТФ зростає. Надмірне надходження екзогенної глюкози призводить до збільшення кількості енергозалежних транспортерів GLUT та SGLT на поверхні клітинної мембрани. Оскільки, ці білки відповідають за реабсорцію глюкози та її подальше виведення в кров, надмірне споживання сахарози збільшує енергетичні витрати на всмоктування глюкози із первинного фільтрату [32].

Проте, у мітохондріальній фракції нирок тварин, які отримували низькопротеїновий/високосахарозний раціон, спостерігається виснаження пулу усіх аденілових нуклеотидів (рис. 1-3). Зокрема, вміст АТФ та АДФ зменшується майже вдвічі на тлі незначного зниження концентрації АМФ. Ймовірно, наслідком такого вираженого зниження вмісту аденілових нуклеотидів буде порушення усіх енергозалежних процесів у нирках, зокрема підтримання водного балансу, реабсорбції, регуляції кислотно-лужного гомеостазу, процесів синтезу біологічно-активних речовин [18].

Підтримання пулу аденілових нуклеотидів відбувається завдяки балансу між трьома основними процесами: синтезом нуклеотидів *de novo*, ресинтезом та катаболізмом до кінцевих продуктів. Ресинтез АТФ з АДФ та неорганічного фосфату з використанням енергії електрохімічного градієнту внутрішньої мітохондріальної мембрани каталізує F_1F_0 -АТФ-аза. Проте, за умов дисбалансу енергетичних субстратів спостерігається порушення мембранного потенціалу і переключення синтазної активності F_1F_0 -АТФ-ази на гідролазну [89].

Результати проведених нами досліджень показали, що у нирках тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, не спостерігається достовірних змін гідролазної активності F_1F_0 -АТФ-ази (рис. 4). Проте у мітохондріальній фракції нирок шурів, які споживали високосахарозний раціон, реєстрували різке підвищення гідролазної активності майже вдвічі порівняно із контрольними показниками. При цьому максимально виражена активація F_1F_0 -АТФ-ази характерна для тварин, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон. З одного боку, встановлені зміни свідчать про порушення мембранного потенціалу [90], тому гідроліз АТФ за досліджуваних умов розглядається як один із можливих способів підтримання концентрації H^+ . З іншого боку, показане нами зростання гідролазної активності F_1F_0 -АТФ-ази може розглядатись як одна із причин встановленого зниження вмісту АТФ у мітохондріях нирок за досліджуваних умов.

Отримані нами дані узгоджуються із літературою [91], що за умов довготривалої гіперглікемії збільшення гідролізу АТФ може бути пов'язано із

зниженням протонного потенціалу, що в свою чергу буде призводити до активації продукування АФК та розвитку окисного стресу.

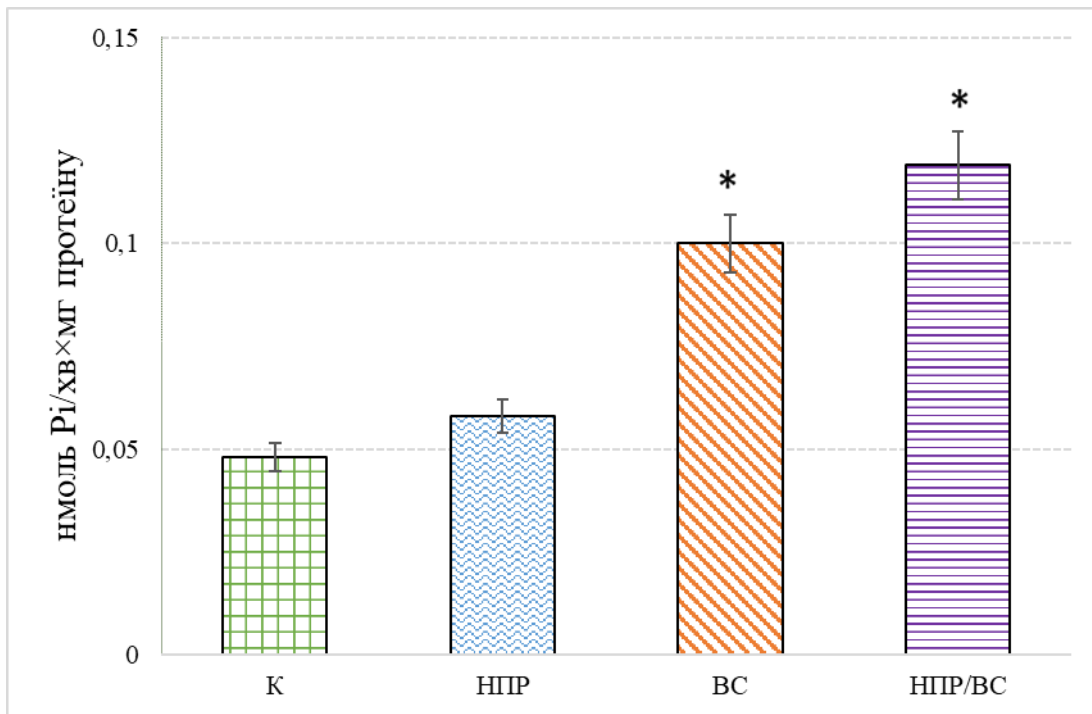


Рис. 4. Гідролазна активність F1F0-АТФ-ази у мітохондріальній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Оскільки одним із шляхів підтримання пулу аденилових нуклеотидів є їх катаболізм, то на наступному етапі наших досліджень було проведено визначення активності ключових ензимів катаболізму аденилових нуклеотидів – АМФ-деамінази та 5'-нуклеотидази. Ці ензими каталізують перетворення АМФ з утворенням різних продуктів: АМФ-деаміназа каталізує дезамінування АМФ до ІМФ з виділенням вільного аміаку, а 5'-нуклеотидаза – дефосфорилування АМФ до аденозину [92]. Тому визначення активностей даних ензимів є необхідним для розуміння особливостей метаболічних перетворень у нирках за умов нутрієнтного дисбалансу.

Результати проведених нами досліджень показали, що у цитозольній фракції групи тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, достовірні зміни АМФ-деаміназної активності відсутні (рис. 5). В той час, за умов дефіциту протеїну у раціоні спостерігається підвищення 5'-нуклеотидазної активності у цитозолі порівняно з інтактними тваринами (рис. 6). Враховуючи,

що продуктом 5'-нуклеотидазної реакції є аденозин – важлива сигнальна молекула, то підвищення 5'-нуклеотидазної активності можна розглядати як компенсаторну реакцію, спрямовану на зростання концентрації аденозину. Показано [93], що завдяки зв'язуванню аденозину з A_{2B} рецепторами на поверхні клітин епітеліоцитів канальців нефрону відбувається запуск РІЗК/Акт сигнального шляху, що забезпечує активацію внутрішньоклітинних захисних механізмів проти апоптозу, індукованого за умов гіперглікемії. Зокрема, доведена роль аденозину у передачі сигналу про інгібування активності каспази-1, що попереджує запуск програми апоптозу клітини [94].

У цитозолі нирок тварин, які споживали високосахарозну дієту, спостерігали достовірне підвищення активностей як АМФ-деамінази, так і 5'-нуклеотидази: АМФ-деаміназна активність збільшилась у майже 3 рази порівняно з показниками контрольної групи щурів (рис. 5), а 5'-нуклеотидазна – приблизно удвічі (рис. 6).

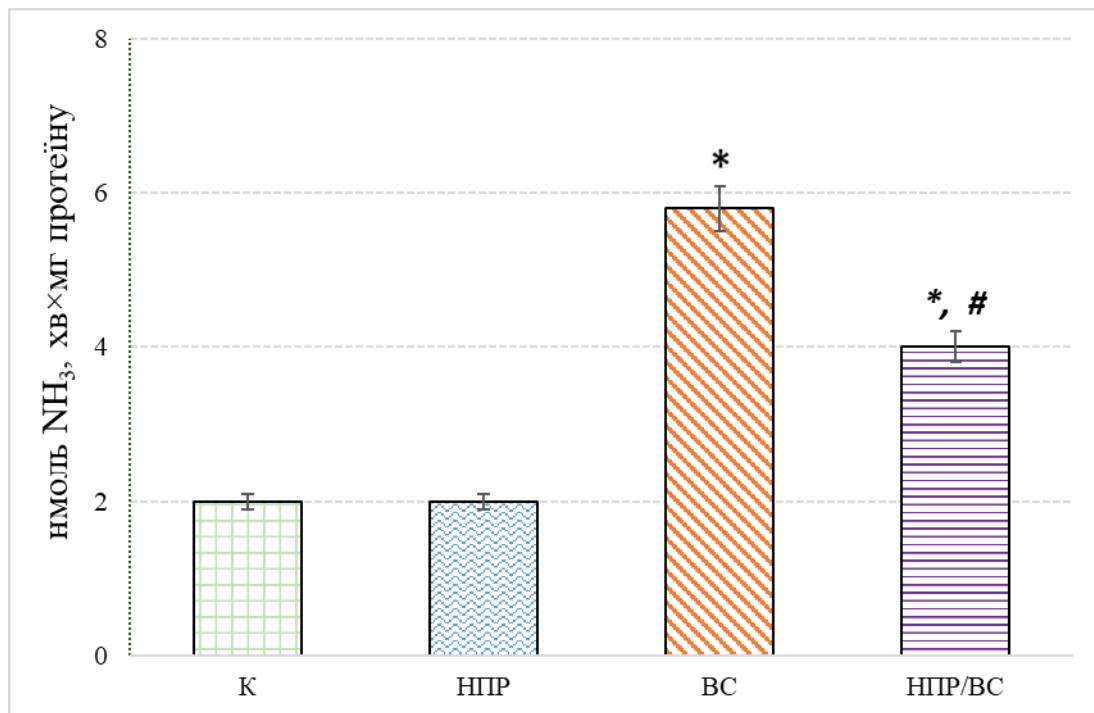


Рис. 5. АМФ-деаміназна активність в цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

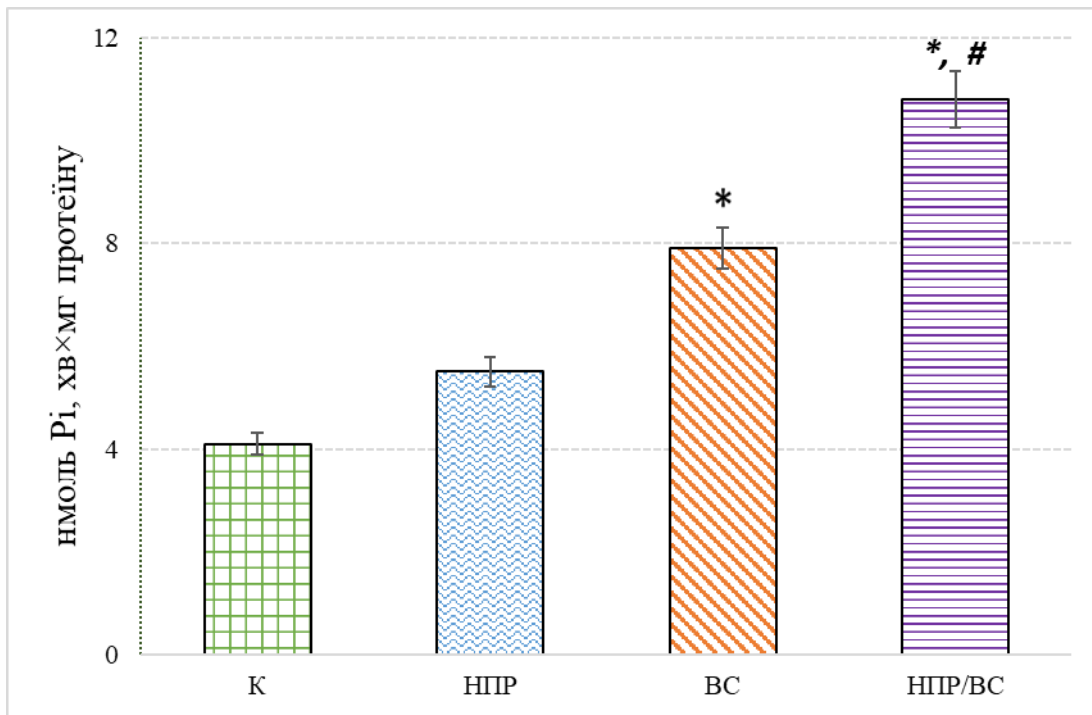


Рис. 6. 5'-нуклеотидазна активність в цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Збільшення активності АМФ-деамінази за досліджуваних умов може відігравати важливу регуляторну роль, оскільки продукт реакції – ІМФ, що надалі перетворюється в інозин. Як показано у літературі [95], інозин є регулятором експресії низки білків, зокрема SOD, SIRT, ІкВ- α та іNOS, що свідчить про важливу роль цієї молекули у активації антиоксидантного захисту та передачі внутрішньоклітинних сигналів. Окрім того, накопичення внутрішньоклітинного інозину інгібує синтез прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-1 β та TNF- α), що запобігає розвитку запального процесу в нирках за умов гіперглікемії.

Крім того, одним із шляхів активації АМФ-дезамінази є її фосфорилювання. Оскільки доведено [96], що за умов гіперглікемії підвищується активність протеїнкіназ, які забезпечують посттрансляційну ковалентну модифікацію АМФ-дезамінази, то саме це може розглядатись як одна з причин зниження вмісту АМФ, що було показано нами раніше (рис. 3).

При цьому результати досліджень показали, що у цитозольній фракції нирок тварин, які споживали низькопротеїновий/високосахарозний раціон,

обидві досліджувані ензиматичні активності перевищують значення контролю, проте 5'-нуклеотидазна активність саме у тварин цієї дослідної групи досягає максимальних значень (рис. 6).

Активация 5'-нуклеотидази за даних умов є закономірною, оскільки продукт 5'-нуклеотидазної активності – аденозин – запобігає втраті мегаліну та кубіліну – рецепторних білків, які забезпечують до 97% реабсорбції альбумінів у проксимальних каналцях нирок за умов розвитку протеїнурії на тлі гіперглікемії [94]. Показано, що за умов гіперглікемії відбувається порушення проникності фільтраційного бар'єру нирок [42], що призводить до розвитку протеїнурії. Збереження мегаліну та кубіліну дозволяє реабсорбувати відфільтровані крізь пошкоджений фільтраційний бар'єр протеїни та амінокислоти і попередити їх втрату за умов нестачі екзогенного білка.

Також, як показано у літературі [65], зв'язування аденозину із $A2_A$ рецепторами на мембрані подоцитів призводить до регенерації цілісності фільтраційного бар'єру за рахунок збільшення синтезу компонентів цитоскелету, що запобігає прогресуванню альбумінурії. У цьому випадку підвищення 5'-нуклеотидазної активності за умов споживання низькопротеїнового/високосахарозного раціону видається цілком логічним.

Окрім того, існують дослідження, які підтверджують роль аденозину в запуску процесів, направлених на полегшення наслідків гіперглікемії: аденозин сприяє редукції локального запалення, спричиненого збільшенням глюкози в люмені ниркових каналців, вазодилатації, що є необхідною умовою для покращення фільтраційного тиску в уражених нирках, а також при зв'язуванні з $A1_A$ рецепторами сприяє зменшенню симптомів реперфузійно-іншемічного пошкодження [97].

Останнім ферментом у метаболічному шляху перетворення аденілових нуклеотидів є ксантинооксидаза, яка каталізує утворення кінцевого продукту катаболізму пуринів – сечової кислоти. Проте, побічним продуктом ксантинооксидазної реакції є супероксид аніон радикал, який має здатність спонтанно дисмутуватись до пероксиду водню.

Результати проведених нами досліджень виявили, що достовірні зміни ксантиноксидазної активності у нирках тварин, яких утримували на низькопротеїновому раціоні, відсутні (рис. 7). Водночас, у нирках тварин, які споживали високосахарозну дієту, виявлено підвищення ксантиноксидазної активності, яка досягає максимальних значень у тварин групи НПР/ВС.

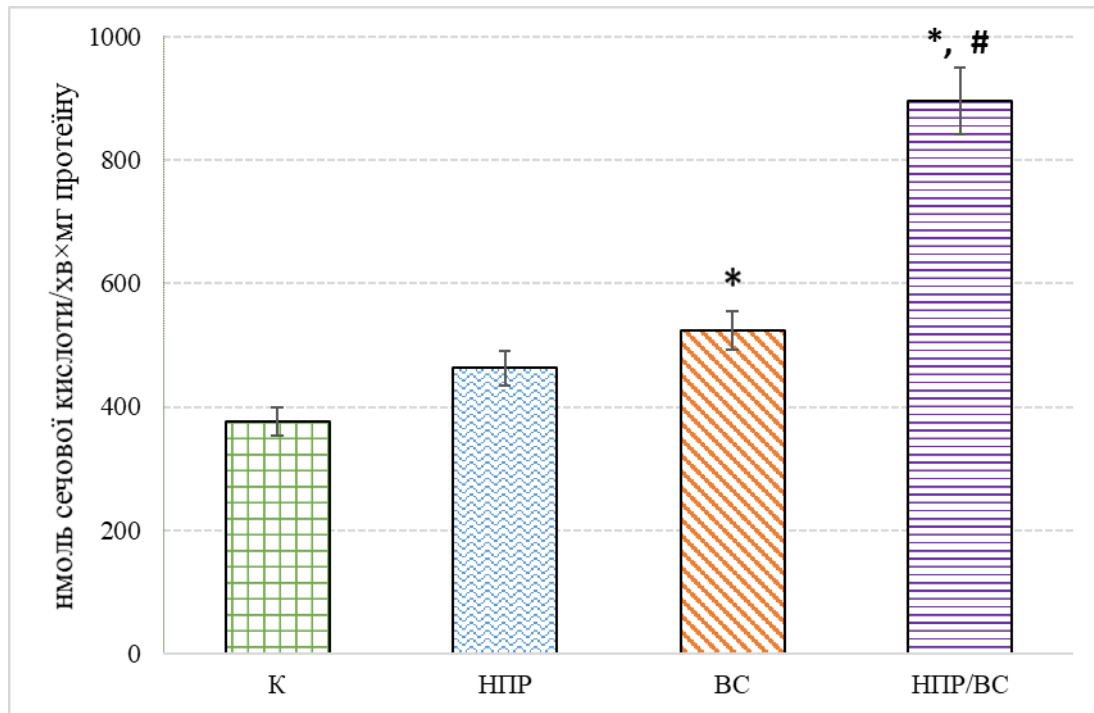


Рис. 7. Ксантиноксидазна активність в цитозольній фракції нирок щурів за умов різної забезпеченості раціону нутрієнтами

Імовірно, причиною підвищення ксантиноксидазної активності є посилення катаболізму аденілових нуклеотидів за участі ключових ензимів цього метаболічного шляху.

У літературі показано [98], що результатом активації ксантиноксидази за умов збільшеного споживання глюкози є утворення супероксид аніону та в подальшому пероксиду водню. Хоча існують дані про важливу роль останнього в трансдукції внутрішньоклітинних сигналів від певних лігандів, високі концентрації H_2O_2 проявляють саме негативний ефект, який супроводжується порушенням функціонування антиоксидантної системи клітини та генерацією додаткових АФК у електронотранспортному ланцюзі мітохондрій за умов збільшення внутрішньоклітинної концентрації глюкози [99]. Надмірне

накопичення основного продукту ксантиноксидазної реакції може призводити до розвитку гіперурикемії, а також до посилення окисного стресу, оскільки у внутрішньоклітинному середовищі сечова кислота володіє прооксидантними властивостями [100].

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що надмірне споживання сахарози на тлі аліментарного дефіциту протеїну супроводжується виснаженням системи аденілових нуклеотидів у мітохондріальній фракції та максимально вираженим підвищенням активностей ензимів катаболізму пуринів у цитозольній фракції нирок щурів, наслідком чого може бути дисбаланс енергозабезпечення клітин нирок з наступним порушенням їх функціональної активності.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що у мітохондріальній фракції нирок тварин за умов споживання низькопротеїнового раціону спостерігається достовірне зменшення концентрації АМФ на тлі збереження вмісту АТФ та АДФ порівняно з контролем. При цьому у нирках тварин за умов споживання низькопротеїнового раціону спостерігається підвищення 5'-нуклеотидазної активності на тлі збереження активностей АМФ-деамінази, ксантиноксидази та F_1F_0 -АТФ-ази на рівні показників контролю.

2. Встановлено, що у мітохондріальній фракції нирок тварин, які отримували високосахарозний раціон, спостерігається підвищення концентрації АТФ, АДФ та АМФ на тлі незначного підвищення гідролазної активності F_1F_0 -АТФ-ази. При цьому для тварин вказаної дослідної групи характерне підвищення активності досліджуваних ензимів катаболізму аденілових нуклеотидів.

3. Показано, що максимально виражені зміни у системі аденілових нуклеотидів характерні для нирок тварин, яких утримували на низькопротеїновій/високосахарозній дієті: спостерігається виснаження пулу всіх аденілових нуклеотидів на тлі максимального збільшення гідролазної активності F_1F_0 -АТФ-ази. Крім того, у цитозольній фракції нирок щурів групи НПР/ВС зареєстровано найвираженіше підвищення АМФ-деаміназної, 5'-нуклеотидазної та ксантиноксидазної активностей.

Отже, отримані результати дозволяють зробити висновок, що надмірне споживання сахарози на тлі аліментарного дефіциту протеїну супроводжується виснаженням системи аденілових нуклеотидів у мітохондріальній фракції та максимально вираженим підвищенням активностей ензимів катаболізму пуринів у цитозольній фракції нирок щурів, наслідком чого може бути дисбаланс енергозабезпечення клітин нирок.