

¹Макух Є.М., к. б. н., доцент, ²Оліярник О.Д., к. б. н., науковий співробітник,
¹Вигнан Д.С., к. б. н., доцент, ¹Красневич А.Я., к. б. н., доцент,
¹Гривул Т. М., к. б. н., доцент ©
¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С.З.Гжицького
²Інститут клінічної і експериментальної медицини, Прага, Чеська республіка

ДЕЯКІ АСПЕКТИ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО МЕТАБОЛІЗМУ 4-ГІДРОКСИНОНЕНАЛЮ

В огляді узагальнено літературні дані про утворення, окремі сторони метаболізму та механізми знешкодження продукту ліпопероксидації 4-гідроксиноненалю.

Ключові слова: 4-гідроксиноненаль, оксидативний стрес, ліпопероксидація, відновлений глутатіон.

Джерела та шляхи утворення 4-гідроксиноненалю. Процеси ліпопероксидації завжди супроводжуються накопиченням високоактивних альдегідів (1,2). Один з них, 4-гідрокси-2,3-транс-ноненаль (4-ГН), найважливіший кінцевий продукт, який утворюється з n-6 поліненасичених жирних кислот, таких як ліолева, ліоленова і арахідонова (2). Завдяки своїй високій реакційній здатності, він взаємодіє з білками, пептидами, фосфоліпідами та нуклеїновими кислотами. Крім того, 4-ГН проявляє високу гепатотоксичну, цитотоксичну активність та мутагенну дію і є компонентом складної системи сигнальних шляхів клітини (3,4,5,6,7).

В умовах оксидативного стресу вміст 4-ГН значно зростає у плазмі крові та клітинах різного типу, окремих органах, особливо у печінці (2,5,8). Але навіть при тяжкому оксидативному стресі, зокрема у пацієнтів з деякими ревматоїдними захворюваннями, його рівень не завжди підвищується (9-11). В окремих випадках спостерігається незначне зростання вмісту 4-ГН в сироватці крові, а в інших, 10-кратне підвищення його рівня. Найвища концентрація 4-ГН (6 мкМ) виявлена у тонкому кишківнику щура на протязі постішемичної реперфузії (12). У пацієнтів з хронічною нирковою недостатністю вміст цього альдегіду у сироватці крові досягає 1мкМ (11), а у пацієнтів з ревматоїдним артритом і хронічній лімфаденомі - 0,5 мкМ (9,10). Тобто, організм має високоефективні механізми попередження токсичної дії цього високореакційного альдегіду навіть в умовах сильного оксидативного стресу і прискореного його накопичення.

Внутрішньоклітинний розпад 4-гідроксиноненалю. Досліди проведені на різних тканинах, отриманих в основному з щурів, показали, що 4-ГН знешкоджується у клітині. Так, його розпад у гепатоцитах щура за три хвилини становив 95 мкМ з 100 мкМ внесених в інкубаційне середовище, що

вказує на високу швидкість його розпаду (13-16). Деградацію 4-ГН вивчали в органелах клітин, зокрема мітохондріях (17) та різних типах клітин: ентероцитах (18), пухлинних клітинах(19, 20, 21, 22), синовіальних фібробластах (23), тимоцитах (24), ендотеліальних клітинах, нейтрофілах, купферових клітинах (25), судинних клітинах, фібробластах (26), а також клітинах перфузованих органів: серці (27), печінці, кишківнику, нирках (28). В цих експериментах встановлено, що розпад 4-ГН в значній мірі залежить, щонайменше, від двох факторів: концентрації клітин в інкубаційному середовищі та його початкової концентрації. По швидкості розщеплення 4-ГН клітини розташувались у такому порядку: гепатоцити, ентероцити тонкого кишківника, асцитні клітини пухлини Ерліха (вихідний вміст 4-ГН -100мкМ). Крім досліджень *in vitro* розпад 4-ГН вивчався і на рівні цілого організму у лабораторних тварин. Для вивчення інтенсивності його деградації використовували сечу або жовч пацюків (29-32).

Найважливіші біохімічні реакції та метаболізм 4-гідроксиноненалу . Найважливіші біохімічні реакції 4-ГН зумовлені наявністю в його структурі активних функціональних груп – спиртової, альдегідної, а також – подвійного зв'язку. Відновлення альдегідної групи веде до утворення відповідного спирту 1,4-дигідроксиноненолу, а її окиснення до - 4-гідроксиноненової кислоти. Крім цих реакцій 4-ГН вступає в реакцію з GSH утворюючи кон'югати GS- 4ГН . Ці реакції каталізують відповідні ензими: НАД-залежна алкогольдегідрогеназа, НАД-залежна альдегіддегідрогеназа та глутатіон-S-трансфераза. Такі ензими, як глутатіонтрансфераза та альдегіддегідрогеназа наявні майже у всіх клітинах ссавців, включаючи і людину.(33,34). Крім названих, у метаболізмі 4-ГН беруть участь інші ензими, зокрема, НАДФ-залежна альдо-кеторедуктаза (35,36).

Кон'югати Міхаеля можуть утворюватися як ензиматичним, так і неензиматичним шляхом. Проте, як показують дослідження, ензиматичний шлях майже у шістьсот разів переважає неензиматичний. Встановлено, що і гідроксиноненова кислота *in vivo* та *in vitro* призводить до швидкого зниження рівня внутрішньоклітинного GSH. При внесенні в інкубаційне середовище 100 мкМ гідроксиноненової кислоти у перші три хвилини вміст GSH в гепатоцитах щурів знизився майже удвічі. Після цього новий рівноважний стан рівня GSH складав 2/3 від початкової концентрації (15,16).

Встановлено, що найбільш важливими ензимами, які беруть участь в метаболізмі 4-ГН, є глутатіон-S-трансфераза, альдегіддегідрогеназа та алкогольдегідрогеназа, мова про які йшла вище. Як виявилось, головними первинними метаболітами 4-ГН є його кон'югати з GSH, тобто – GS-4-ГН, продукт окиснення альдегідної групи –гідроксиноненова кислота, а також 1,4-дигідроксиноненол. Виявлено, що більшість клітин, включаючи і гепатоцити, відрізняються вмістом цих метаболітів. Цікаво, що вміст кон'югатів GS-4-ГН та гідроксиноненової кислоти переважає кількість 1,4-дигідроксиноненолу. Розробка чутливих методів дозволила в останні роки повністю встановити баланс метаболітів 4-ГН. В гепатоцитах щура після двохвилинної інкубації 4-

ГН було виявлено, що частка кон'югатів 4-ГН і GSH становить 30%, аналогічна кількість характерна і для гідроксिनореноевої кислоти, а 1,4-дигідроксिनоренолу було у три рази менше (15, 16). Вміст цих трьох первинних метаболітів перетворення 4-ГН завжди зменшувався після внесення його в інкубаційне середовище. Різниця між кількістю внесеного в інкубаційне середовище 4-ГН і утворенням первинних продуктів показують, що в цьому процесі утворюються ще й інші вторинні метаболіти, вода, діоксид Карбону, проміжні продукти ЦТК, а також кон'югати GSH з 1,4-гідроксिनоренолом і гідроксिनореноевою кислотою (21), гліцин-цистеїн-4-ГН, цистеїн-4-ГН та меркаптурові кислоти (28).

Вплив 4-гідроксिनореналу на внутрішньоклітинну модифікацію білків. Незважаючи на швидкий розпад 4-ГН, він має негативний вплив на внутрішньоклітинні біополімери, зокрема модифікацію білків. Залежно від чутливості до дії 4-ГН досліджувані клітини умовно можна поділити на три групи: а) клітини малочутливі до дії 4-ГН - зв'язування білків складає до 1,5%: це клітини кишківника-ентероцити і асцитні 12-денні клітини пухлини Ерліха; б) середньої чутливості - зв'язування білків складає від 2,5 до 4 %: сюди належать тимоцити, гепатоцити, синовіальні фібробласти; в) високочутливі клітини складають 4-8%: білки мітохондрій печінки, п'ятиденні асцитні клітини пухлини Ерліха. Слід зазначити, що "старші" клітини пухлини Ерліха майже в чотири рази чутливіші до впливу 4-ГН, ніж "молодші", тобто п'ятиденні.

Встановлено також, що 4-ГН проявляє свій гальмуючий вплив і на ферментні білки. Слід зазначити, що ензими проявляють різну чутливість до дії 4-ГН. Наприклад, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа печінки щура втрачає половину активності при дії 70 мкМ альдегіду, аденілатциклаза печінки щура – при 2,7 мкМ, ДНК- полімераза бета печінки щура-290 мкМ, ДНК- полімераза альфа печінки щура-370 мкМ, Na-K-АТФ-аза кори головного мозку свині-120 мкМ, АДФ-рибозилтрансфераза синовіальних фібробластів людини-4,6 мкМ, НАДФН-оксидаза нейтрофілів людини-19 мкМ (2,15,37). Кон'югати утворені 4-ГН з білками розпадаються з участю протеасом, або акумулюються (якщо вони не розпадаються), що в кінцевому результаті веде до цитотоксичних явищ: пошкодження і загибелі клітин.

Слід зазначити, що зв'язування білків з 4-ГН є більш важливим щодо процесів, які ініціюють вільнорадикальні реакції. Фізіологічне і патофізіологічне значення цього явища було вивчено як для специфічних білків, зокрема ліпопротеїнів низької щільності (38), так і ензимів, наприклад, гліцеральдегідфосфатдегідрогенази (39), глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (40), Na-K- АТФ-ази (37). Встановлено, що 4-ГН модифікує сульфгідрильні групи білкових молекул, викликаючи зниження активності тіолових ензимів, зокрема глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (40). Механізми хімічної взаємодії алкеналу і гідроксиалкеналу з білками інтенсивно і плідно вивчалися групою дослідників (38, 39,40,41, 42, 43). Дослідженнями цих авторів встановлені деякі механізми акумуляції альдегід – модифікованих білків в організмі. У процесі їх

накопичення вони можуть впливати на функціональний стан білків, особливо в онтогенезі, а також при різних патологічних станах організму (44).

Висновки. Різноманітні шляхи внутрішньоклітинного розпаду 4-ГН є одним з важливих механізмів антиоксидантного захисту як клітин зокрема, так і організму в цілому, а також - токсичної дії альдегід – модифікованих білків продуктами ПОЛ, в тому числі 4-ГН.

Література

1. Poli G., Albano E., Dianzani M. // *Chem.Phys. Lipids.*-1987.- V.45.- P. 117-142.
2. Esterbayer H., Zollner H., Schaur R.J. // *Free Radic. Biol. Med.* 1991.- V.11.- P. 81-128.
3. Esterbayer H., Zollner H., Schaur R. J. // *ISI Atlas Sci.* - 1988.- V.1.- P.311-317.
4. Uchida K., Shiraishi M., Naito Y. et al. // *J.Biol. Chem.* -1999.- V.274.- P. 2234-2242.
5. Poli G., Schaur R. J. // *Life.*-2000.- V.50.- P.315-321.
6. Ji C., Amarnath V., Pietenpol J.A. et al. // *Chem. Res. Toxicol.*-2001.- V.14.- P.1090-1093.
7. Ruef J., Voser M., Bode C. et al. // *Basic Res. Cardiol.* -2001.- V.96.- P.143-150.
8. Comporti M. // *Lab. Invest.* - 1985.- V.53.- P.599-623
9. Grune T., Michel P., Sitte N. et al. // *Free Radical Biol. Med.* - 1997.- V.23. - P.357-360.
10. Siems W., Brenke R., Beier A., et al. // *QJM.* -2002.- V.95.- P.803-809.
11. Siems W., Carluccio F., Grune T. et al. // *Clin. Nephrol.* -2002.- V.58 (Suppl 1). - P.20-25.
12. Siems W.G., Grune T., Esterbayer H. // *Life Sci.*-1995.- V.57.- P.785-789.
13. Esterbayer H., Zollner H., Lang J. // *Biochem. J.* - 1985.- V.228.- P.363-373.
14. Siems W.G., Zollner H., Grune T. et al. // *Fres. J. Anal. Chem.* - 1992.- V. 343.- P.75-76.
15. Siems W.G., Capuozzo E., Verginelli D. et al. // *Free Radic. Res.*- 1997.- V. 27.- P. 353-358.
16. Siems, W., Zollner, H., Grune, T. et al.// *J. Lipid Res.* - 1997. - V. 38. - P. 612-622.
17. Ullrich O., Grune T., Henke W. et al. // *FEBS Lett.* - 1994.- V. 352.- P. 84-86.
18. Grune T., Siems W., Kowalewski J. et al. // *Biochem. Internat.* – 1991. – V. 25. - P. 963-971.
19. Siems W.G., Grune T. // *Mol. Aspect Med.* -2003. – V.24. – P.167-175.
20. Canuto R. A., Muzio G., Maggiora M. et al. // *Cell. Biochem. Fund.* - 1993.V. 11.-P. 79-86.
21. Grune T., Siems W.G., Zollner H. et al. // *Cancer Res.*- 1994.-V. 54.-P. 5231-5235.

22. Tjalkens R. B., Cook L.W., Petersen D. R. // Arch. Biochem. Biophys.- 1999.-V. 361.-P. 113-119.
23. Ullrich O., Huser H., Ehrlich W. et al. // Free Radic. Biol. Med.- 1997. - V. 22.- P. 1153-1157.
24. Siems W., Pirnenov A.M., Esterbauer H. et al. // J. Biochem.-1998. -V. 123.- P. 534-539.
25. Luckey S.W., Petersen D.R. // Arch.Biochem. Biophys.- 2001. - V. 38.- P. 77-83.
26. Spitz D.R., Sullivan S.J., Malcolm R.R. et al. // Free Radic. Biol. Med. - 1991.- V. 11. – P. 415-423.
27. Srivastava S., Chandra A., Wang L.-F. et al // J. Biol. Chem.- 1998. - V. 273. - P. 10893-10900.
28. Grune T., Siems W.G., Petras P. // J. Lipid Res.- 1997. - V. 38.- P. 1660-1665.
29. Alary J., Bravais F., Cravedi J-P. et al. // Chem. Res. Toxicol.-1995.- V. 8.- P. 34-39.
30. Alary J., Debrauwer L., Fernanadez Y. et al. //Chem. Res. Toxicol. 1998.- V. 11. – P. 130-135.
31. Alary J., Debrauwer L., Fernandez Y. et al. // Chem. Res. Toxicol.- 1998.- V. 11.- P. 1368-1376.
32. Laurent A., Alary J., Debrauwer L. et al. // Chem. Res. Toxicol.- 1999. - V. 12. - P. 887-894.
33. Berhane K., Widersten M., Engstrom A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -1994.- V. 91.- V. – P. 1480-1484.
34. Singhal S.S., Zimniak P., Awasthi S. et al. //Arch. Biochem. Biophys.- 1994.- V. 311. – P. 242-250.
35. Srivastava S.K., Ansari N.H., Hair G.A. et al. // Biochim. Biophys. Acta. - 1984.- V. 800. – P. 220-227.
36. Spycher S.E., Tabataba-Vakili S., O'Donnell V.B. et al. 1997. // ASEB J. - 1997. - V.11. – P. 181-188.
37. Siems W.G., Hapner S.J., van Kuijk F.J.G.M. // Free Radic. Biol. Med.- 1996. – V. 20. – P. 215-223.
38. Uchida K., Toyokuni S., Nishikawa K. et al. // Biochemistry. – 1994. – V. 33. – P. 12487-12494.
39. Uchida K., Stadtman E.R. //J. Biol. Chem.- 1993. - V. 268. – P. 6388-6393.
40. Friguet B., Stadtman E.R., Szweda L.I. // J. Biol. Chem.- 1994. – V. 269. – P. 21639-21643.
41. Stadtman, E.R. // Science. 1992. – V. 257. – P. 1220-1224.
42. Uchida K., Stadtman E.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1992. - V. 89. – P. 5611-5615.
43. Toyokuni S., Uchida K., Okamoto K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1994. – V. 91. – P. 2616-2620.
44. Chiarpotto E., Biasi F., Scavezza, A. et al.// Biochem. Biophys. Res. - 1995. – V. 207. – P. 477-484.

Summary

¹Makukh Ye.M., ²Oliyarnyk O.D., ¹Vygnan D.S., ¹Krasnevych A.Ya.,
¹Hryvul T.M.

¹*S. Z. Gzhyskyi Lviv National University of veterinary medicine and
biotechnology of 50, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine*

²*Institute for Clinical and Experimental Medicine Prague, Czech Republic*

**SOME ASPECTS OF INTRACELLULAR 4-HYDROXYNONENAL
METABOLISM**

*The literary data about some aspects of intracellular metabolism 4-
hydroxynonenal have been summarized.*

Key words: *4-hydroxynonenal, oxidative stress, lipid peroxidation, reduced
glutathione.*

Рецензент – д.вет.н., професор Гуфрій Д.Ф.