



УДК 576.311.348.7+543.272.3:616.379-008.64

## ОСНОВНІ МЕХАНІЗМИ ВИНИКНЕННЯ ТА РОЗВИТКУ ДІАБЕТИЧНИХ УСКЛАДНЕНЬ: РОЛЬ НІТРАТИВНОГО СТРЕСУ

**В. Р. Дрель**

*Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна  
e-mail: drelvictor@gmail.com*

В огляді розглянуто основний механізм виникнення оксидативного стресу за участю електрон-транспортного ланцюга мітохондрій при гіперглікемії. Описано основні метаболітні й сигнальні механізми, активація яких має місце за умов хронічних діабетичних захворювань і які ведуть до посилення оксидативного стресу. Детально проаналізовано роль оксиду азоту в біологічних системах, а також умови, за яких має місце оксидативно-нітративний стрес, зокрема при цукровому діабеті. Узагальнено результати досліджень стосовно основних біологічних мішеней пероксинітриду, а також молекулярних маркерів діабетичних захворювань.

**Ключові слова:** цукровий діабет, глікозилювання, пероксинітрид, оксидативно-нітративний стрес, полі-ADP-рибозилування.

### ВСТУП

Швидкі темпи індустріалізації поряд зі зменшенням фізичного навантаження, покращення раціону харчування у другій половині ХХ ст. призвели до значного зростання захворювань людей на цукровий діабет, особливо це стосується 2 типу. Цукровий діабет прийнято називати епідемією ХХІ століття, адже це захворювання продовжує прогресувати – за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у 2009 р. на нього хворіли вже більше 240 млн людей. При цьому найбільше поширення цукрового діабету відзначається у віковій групі 30–39 років. Цукровий діабет підвищує смертність у 2–3 рази, ризик ішемічної хвороби серця й інфаркту міокарда більш ніж у 2 рази, патологію нирок у 17 разів, ризик гангрен нижніх кінцівок у 20 разів, гіпертонії – більш ніж у 3 рази. Серед усіх захворювань смертність від діабетичних ускладнень займає третє місце і становить понад 3 млн людей на рік [2, 50, 95].

Як відомо, гіперглікемія є основним маркером діабету, незалежно від його типу (1 чи 2). Показано, що в результаті гіперглікемії посилюється утворення вільних радикалів, насамперед супероксид-аніона, який, взаємодіючи з іншими сполуками, перетворюється на гідроксил-радикал, пероксид водню та пероксинітрид (ONOO<sup>-</sup>) [72]. Зростання вмісту пероксинітриду, який на сьогодні є визнаним оксидантом номер один у біологічних системах, призводить до розвитку оксидативно-нітративного стресу. Основну свою негативну функцію пероксинітрид виявляє шляхом модифі-

кації (нітрування в 3 положенні ароматичного кільця) тирозинових залишків у структурі білків, у результаті чого останні можуть втрачати свої біологічні функції, особливо це критично для ензимів і сигнальних молекул. Крім модифікації білків, пероксинітрит значно посилює перекисне окиснення ліпідів, розриви ДНК, що, у свою чергу, призводить до активації полі(ADP-рибозо)полімерази-1 (PARP-1), індукції некрозу й апоптозу [72].

Вивчення молекулярних механізмів виникнення і розвитку патологічних змін, які мають місце за умов виникнення цукрового діабету, є важливою проблемою біохімії та молекулярної біології, оскільки дасть можливість краще розуміти усі процеси, які відбуваються за даної патології, допоможе у розробці нових ліків і виявленні маркерних показників для контролю перебігу захворювання та лікування. У роботі проаналізовані й узагальнені наявні в літературі дані про основні порушення метаболізму і шляхів сигналювання, виникнення яких є критичним за умов цукрового діабету, детально розглянуто роль оксиду азоту і його ролі за даної патології. Наведено також власні дані щодо розвитку нітративного стресу у ряді тканин при використанні тваринних моделей 1-го і 2-го типів діабету і різних інтервалів захворювання.

### **1. Механізми, які лежать в основі надпродукції супероксид-аніона, та можуть посилювати оксидативний стрес як передумову виникнення діабетичних ускладнень**

На даний час не викликає сумніву твердження, що основною характеристикою виникнення діабету, незалежно від його типу, є підвищений вміст глюкози, або гіперглікемія в кровотік. Виникнення 1-го типу діабету характеризується зменшенням або повною відсутністю гормону інсуліну, причиною чого можуть слугувати різні фактори, у тому числі й такі, які є залученими до регуляції гомеостазу глюкози. Тоді ж як за умов 2-го типу діабету, який становить 85–90% усіх форм діабету, є характерною інсулінорезистентність, або погіршення взаємодії інсуліну з рецептором до інсуліну в різних типах клітин і тканин з нормальним або навіть підвищеним вмістом інсуліну, концентрація якого, однак, на пізніх стадіях захворювання може зменшуватись. Встановлено, що за фізіологічних умов і чіткої регуляції інсуліном основними споживачами глюкози є м'язова і жирова тканини. Печінка допомагає в регуляції рівня глюкози, знижуючи її секрецію в кровотік за наявності інсуліну, запасаючи її у глікоген і тригліцериди. У результаті патологічних змін спостерігається послаблення споживання тканинами глюкози з кровотоку, локальне збіднення тканин на внутрішні запаси глюкози у вигляді глікогену і тригліцеридів [60]. Отже, для обох основних типів діабету основною загальною рисою є проблема підвищення глюкози у крові внаслідок її поганого поглинання оточуючими тканинами.

Водночас було виявлено, що за умов цукрового діабету вибірково ушкоджуються лише деякі типи тканин. Більш детальні дослідження показали, що у м'язовій і жировій тканинах транспорт глюкози здійснюється завдяки інсулінозалежному механізму, при якому транспортер глюкози-4 (GLUT4) за відсутності сигналу від інсулінового рецептора переважно міститься у мікровезикулах цитоплазми, і незалежно від рівня глюкози в кровотоку, внутрішньоклітинний транспорт її не здійснює [38]. У той же час ендотелій кровоносних судин, мезангіальні клітини ниркових клубочків, нейрони, Шванівські клітини, та деякі специфічні клітини (такі, як подоцити, перицити) містять в основному інсулінонезалежні транспортери глюкози-1 та 3, які постійно представлені на поверхні клітин і постійно переносять глюкозу з кровотоку всередину клітин, як тільки її концентрація в зовнішньому середовищі перевищить її вміст усередині

клітини, а кількість їхня може навіть збільшуватись у відповідь на збільшення концентрації глюкози [61].

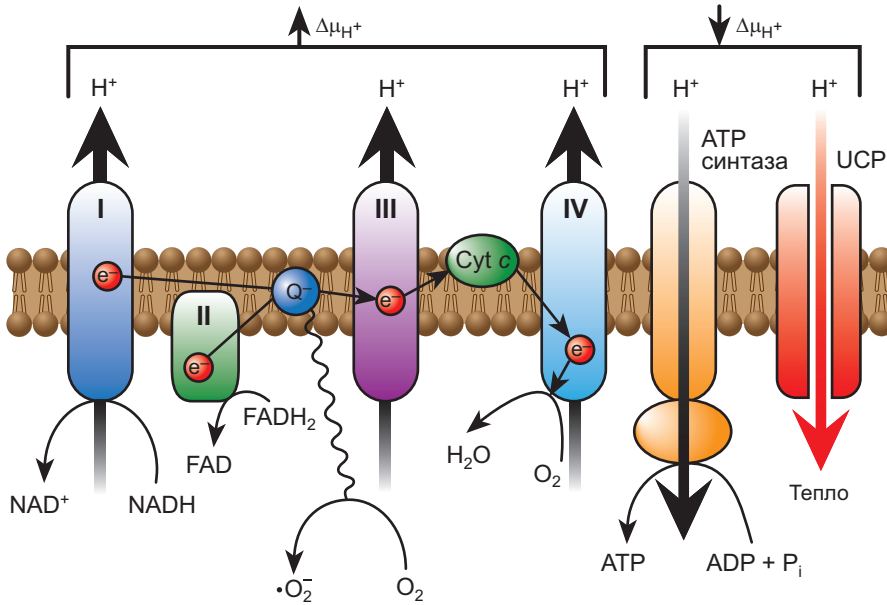
Як відомо, під час метаболізму глюкози за фізіологічних умов у циклі трикарбонних кислот (ЦТК) утворюються електронні переносники, головним із яких є NADH – він передає свій електрон комплексі I електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Інший електронний донор, який генерується в ЦТК – FADH<sub>2</sub>, передає свій електрон до комплексу II. Електрони з обох комплексів передаються на коензим Q, а потім переносяться до комплексу III, цитохрому c, комплексу IV і врешті-решт до молекули кисню, яку вони відновлюють до води. Енергія, яка вивільняється під час передачі електрона частково використовується комплексами I, III, і IV на перекачування протонів через внутрішню мембрану мітохондрій – з матриксу в міжмембранний простір. У результаті цього генерується електрохімічний потенціал протонів (комбінації градієнта протонів і електричної напруги) на внутрішній мембрані мітохондрій. Енергія цього потенціалу використовується на синтез ATP за допомогою ATP-синтази. Рівень ATP у клітині за фізіологічних умов підтримується сталим. У випадку її надпродукції в діяльність вступають мітохондріальні роз'єднуючі білки (UCPs), які починають пропускати протони у зворотному напрямку, запобігаючи формуванню електрохімічного потенціалу [91, 94].

Водночас у названих вище клітинах, позбавлених механізму запобігання транспортуванню надлишку глюкози з кровотоку в цитоплазму та/або її реекспорту за умов гіперглікемії, починається її накопичення. Це, у свою чергу призводить до інтенсифікації гліколізу, ЦТК, що врешті зумовлює відповідну інтенсифікацію роботи електрон-транспортного ланцюга мітохондрій. Мембранний потенціал зростає до критичної межі, що призводить до блокування III комплексу мітохондрій, і електрон із коензима Q починає передаватися молекулі кисню з утворенням радикала супероксид-аніона ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) (рис. 1.) [13]. За умов гіперглікемії мітохондріальна супероксиддисмутаза (Mn-SOD) не справляється з надходженням великої кількості супероксид-аніона, у результаті чого і починається оксидативний стрес.

Виникнення оксидативного стресу за участю електрон-транспортного ланцюга мітохондрій було підтверджено в експериментах з моделюванням надпродукції мітохондріальної супероксиддисмутази та UCPs. У результаті надпродукції мітохондріальної супероксиддисмутази весь супероксид деградував, а надпродукція UCPs призводила до запобігання формуванню електрохімічного потенціалу, з одного боку, та нормальної роботи електрон-транспортного ланцюга, в мітохондріях, з іншого боку [65].

При взаємодії  $\cdot\text{O}_2^-$  з оксидом азоту в клітині утворюється надзвичайно цитотоксична сполука – пероксинітрит ( $\text{ONOO}^-$ ), який безпосередньо або опосередковано може взаємодіяти з рядом молекул у клітині, модифікуючи їхні біологічні функції. Так виникає так званий оксидативно-нітративний стрес, який супроводжується нітруванням білків, перекисним окисненням ліпідів, розривами ДНК, змінами у клітинному сигналюванні, активацією PARP-1, що зрештою призводить до порушення метаболізму і шляхів сигналювання у клітинах, які є характерними для діабетичних ускладнень [13, 72].

Було виявлено, що у відповідь на ушкодження ДНК активними формами кисню й  $\text{ONOO}^-$  активується репараційний комплекс, до складу якого входить ензим PARP. Даний ензим полі-(ADP) – рибозилує цілий ряд протеїнів ядра та ензим гліколітичного циклу гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH), який може транслюкуватись у ядро та з нього [81]. Пригнічення активності GAPDH поряд із високим вмістом глюкози у клітині призводить до накопичення проміжних продуктів катаболізму глю-



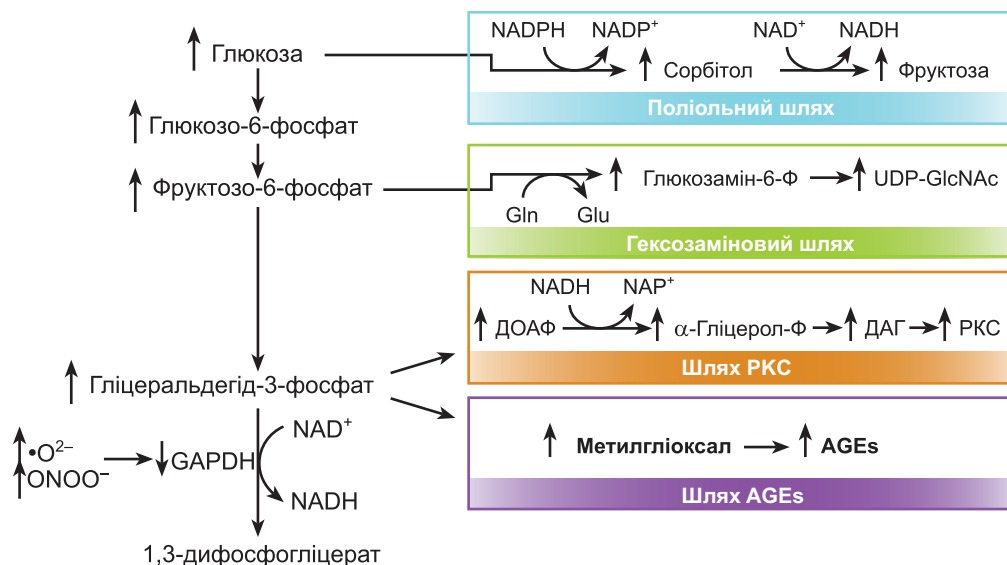
**Рис. 1.** Гіперглікемією-індукований процес утворення супероксид-аніона ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) електронтранспортним ланцюгом мітохондрій

**Fig. 1.** Hyperglycemia-induced production of superoxide ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) by the mitochondrial electron transport chain. ATP-синтаза – ATP synthase; тепло – heat

кози в гліколітичному ланцюзі її розщеплення до стадії утворення гліцеральдегід-3-фосфату, з відповідним пригніченням наступної стадії, що і призводить до активації поліольного, гексозамінного шляхів, накопичення продуктів та попередників неензиматичного глікозилювання й активації протеїн кінази С (PKC) (рис. 2).

Майклом Браунлі (Michael Brownlee) було сформульовано уніфіковану теорію виникнення діабетичних ушкоджень, в основі якої лежать вищеперелічені чотири механізми [13]. Усі ці механізми зумовлюють значне посилення неензиматичного глікозилювання, яке і так є значним при гіперглікемії, порушення багатьох біохімічних і фізіологічних параметрів, збіднення клітин на ендogenous антиоксиданти й енергетичні ресурси. У результаті реакцій неензиматичного глікозилювання за участю ряду вуглеводів та їхніх похідних з протеїнами утворюються так звані кінцеві продукти глікозилювання (AGEs), які можуть накопичуватись як усередині клітини, так і поза нею, та порушувати функціонування окремих молекул і клітини в цілому [78]. Внутрішньоклітинні AGEs, як правило, досить швидко деградує шляхом протеолізу, а для позаклітинних, які є довгоживучими, існують спеціальні механізми видалення.

Так, для видалення довгоживучих AGEs (білків позаклітинного матриксу і крові), які також можуть накопичуватись і з віком, існує декілька механізмів, включаючи ензиматичний репараційний механізм. Однак основним механізмом є видалення таких білків і їхня протеолітична деградація за участі специфічних рецепторів до AGEs – RAGEs [78]. Такі рецептори виявлено в ендотеліальних клітинах, моноцитах, макрофагах та ін. [66]. При взаємодії AGEs із рецептором відбувається активація цілого каскаду сигнальних механізмів, що призводить до зростання експресії та виділення ряду прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , інтерлейкінів 1, та 6), вазоконстрикторів – ендотеліну-1, молекул адгезії (ICAM-1, VCAM-1) та ростових факторів,



**Рис. 2.** Чотири основних механізми (поліольний, гексозаміний, активація PKC та накопичення кінцевих продуктів глікозилювання), активація яких за умов гіперглікемії та надпродукції супероксиду значно посилюють оксидативний стрес і ведуть до виникнення хронічних діабетичних уражень. UDP-GlcNAc – UDP-N-ацетил-D-глюкозамін; ДАОФ – діоксиацетонфосфат; ДАГ – діацилгліцерол; GAPDH – гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа

**Fig. 2.** Hyperglycemia and superoxide mediated activation of four major pathways (polyol and hexosamine pathway, activation of PKC and increases of advanced glycation end products) leads to the increase of oxidative stress and to the chronic diabetic complications.

Глюкоза – glucose; глюкозо-6-фосфат – glucose-6-phosphate; фруктозо-6-фосфат – fructose-6-phosphate; гліцеральдегід-3-фосфат – glyceraldehyde 3-phosphate; 1,3-дифосфогліцерат – 1,3-bisphosphoglycerate; сорбітол – sorbitol; фруктоза – fructose; глюкозамін 6-Ф – glucosamine-6-phosphate; UDP-GlcNAc – uridine diphosphate N-acetylglucosamine; ДАОФ – dihydroacetone phosphate;  $\alpha$ -гліцерол-Ф –  $\alpha$ -glycerolphosphate; ДАГ – diacylglycerol; метилгліоксал – methylglyoxal

що порушують функцію судин і сприяють передчасному розвитку атеросклерозу, запальним процесам [66, 78, 84]. Для запальних процесів характерною є активація імункомпетентних клітин, з відповідною активацією індукцибельної NO-синтази, що, у свою чергу, призводить до локального збільшення концентрації NO в сотні-тисячу разів понад норму, залежно від типу клітин [72]. Таким чином, зростання концентрації NO за умови високого вмісту  $\bullet\text{O}_2^-$  буде індукувати збільшення концентрації пероксинітриту. Накопичення AGEs є характерним для хронічних ускладнень – діабетичних ретинопатій, нейропатій і нефропатій [66, 78]. Таким чином, рівень AGEs і їхніх попередників, як і вміст продуктів поліольного шляху, вважаються маркерними показниками ступеня ушкоджень тканин при діабеті.

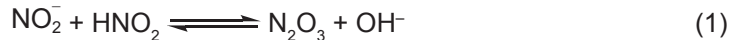
## 2. Роль NO в біологічних системах

NO, як відомо, є вторинним посередником у передачі клітинних сигналів, модулятором біологічних функцій білків, а також може проявляти функції оксиданта й антиоксиданта. Він за активністю займає проміжне місце між досить інертним азотом і досить активним киснем, а оскільки містить один неспарений електрон на зовнішній орбіталі, то може виступати також як радикал ( $\bullet\text{NO}$ ). Крім того, за своїми фізико-

хімічними властивостями дана молекула не має якихось бар'єрів у переміщенні, і швидкість її переміщення у водній і ліпідній фазах є приблизно однаковою [72].

В організмі існують два основні механізми утворення оксиду азоту *in vivo*: ферментативний і неферментативний. Ферментативний синтез NO в клітинах здійснюється родинною білків NO-синтаз [6]. Утворення NO здійснюється шляхом перетворення L-аргініну на L-цитрулін у реакції, каталізованій NO-синтазою за допомогою приєднання двох атомів кисню [57]. Залежно від тканин, із яких вперше ізоформи NO-синтази (NOS) були виділені, їх поділяють на нейрональну (nNOS), ендотеліальну (eNOS) (або їх ще називають конститутивними) та індукційну (iNOS) [34]. Для активації nNOS і eNOS необхідна присутність іонів  $\text{Ca}_2^+$  і кальмодуліну, і вони забезпечують відносно сталий рівень NO у відповідних тканинах. Так добова продукція NO лише одним ендотелієм сягає близько 1,7 мМ, а стаціонарна концентрація NO у плазмі крові перебуває в діапазоні 3 нМ [48]. iNOS є  $\text{Ca}_2^+$ -незалежною, її синтез часто пов'язують зі стресовими ситуаціями. Так, наприклад, у вогнищах запалення iNOS може бути присутня в нейтрофілах і макрофагах, і у відповідь на дію цитокінів або ліпополісахаридів може продукувати у сотні разів більше NO, ніж конститутивні NOS. Крім того, під час патологічних умов, iNOS постійно надекспресується на рівні транскрипції [1].

Під неферментативним шляхом утворення NO розуміють відновлення нітритів або нітратів до NO. Виділяють два основних механізми: реакція диспропорціонування нітриту і відновлення нітриту в присутності гемопротейнів (гемовмісних білків), які мають нітритредуктазну активність. Реакція диспропорціонування може відбуватися при закисненні середовища (наприклад, при ішемії або запаленні) і стає істотною при  $\text{pH} < 6$  [80]. Було запропоновано такі реакції:



Серед гемовмісних білків, які мають нітритредуктазну активність, виділяють гемоглобін (Hb), міоглобін, цитохром с оксидазу, цитохром P-450, ксантин оксидоредуктазу [67, 82]. Для Hb було запропоновано таку схему:



Було також запропоновано, що вміст NO, нітратів і нітритів в організмі перебуває у певному гомеостазі, і у разі зниження якогось із них відбувається компенсаторний зсув даної рівноваги в бік утворення необхідного компонента [82].

Прийнято вважати, що основною біологічною функцією NO є його здатність змінювати активність ферментів, взаємодіючи з їхніми функціонально-важливими групами, у першу чергу, з залізом гема (гемовмісних білків, константа взаємодії для яких  $10^3\text{--}10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , залежно від оточення гема), утворюючи нітрозильні комплекси та тіолами, а також нітрозосполуки.

Найбільш вивченим прикладом функціонування NO є активація гуанілат-циклази. Так, приєднання NO до заліза гема регуляторної субодиниці гуанілат-циклази викликає розрив зв'язку між залізом і азотом імідазольної групи гістидину, внаслідок чого змінюється як структура активного центру, так і конформація ензиму [87]. Активність ферменту зростає в десятки разів, що призводить до збільшення рівня циклічного GMP (сGMP). Залежно від типу клітин, відбуваються різні ефекти активації гуанілат-циклази: у тромбоцитів відбувається зниження агрегаційної здатності, у гладеньких м'язів відбувається розслаблення, що відіграє важливу роль у регуляції тону судин та ін.

Крім гуанілат циклази NO, може взаємодіяти з гемами цитохрому a3 і Cu<sub>v</sub> цитохром с оксидази – термінального акцептора електрон-транспортного ланцюга мітохондрій, що призводить до зворотного інгібування клітинного дихання [11, 12]. Крім того, при взаємодії з гемовмісними білками, NO може вступати в окисно-відновні реакції, проявляючи властивості відновника. NO може інгібувати роботу циклооксигенази і ліпоксигенази за рахунок відновлення проміжних сполук пероксидазного циклу, які утворюються в ході ензиматичних реакцій [35], а також відновлювати ферил гемоглобін (Fe<sub>4</sub><sup>+</sup>Hb) до metHb [36].

До біологічних властивостей NO належить також його здатність нітрозилувати SH-групи ряду білків, що у випадку ензимів може впливати на їхню активність. Так, взаємодіючи з SH-групами глутаматних рецепторів постсинаптичних мембран, NO їх інгібує, модулюючи передачу нервових імпульсів у нейронах головного мозку [54]. Таким чином, реакції S-нітрузування/денітрузування протеїнів є одним із механізмів передачі внутріклітинних сигналів. Одним із таких механізмів може відбуватись активація/деактивація каспази 3 [49]. Крім того, показано, що NO може нітрозилувати SH-групи білків, що беруть участь у транспорті й депонуванні металів змінної валентності, наприклад металотіонеїнів [75].

За здатністю взаємодіяти з гемовим залізом (гемовмісних білків) і тіолами NO може не лише модифікувати активність ряду ензимів, але і запасатись організмом. Вважають, що NO в клітинах утворює стабільні динітрозильні залізо-сірковмісні комплекси, за участю тіоловмісних білків або низькомолекулярних тіолів (цистеїну або глутатіону) і негемового заліза [92]. Саме такі комплекси утворюються в макрофагах і ендотеліальних клітинах, і їх розглядають як основний пул NO в організмі [62]. Крім того, NO при взаємодії з S-нітрозотіолами (реакція нітрозилування) може також депонуватись у клітинах [96]. Так, із найбільш стабільних нітрозопохідних є S-нітрозопротеїни, характерним представником яких є нітрозильований альбумін, і яких у плазмі крові є близько 95% від усього вмісту нітрозильованих білків [56]. Крім того, виявлено, що концентрація S-нітрозотіолів у плазмі в 3–4 рази більша, ніж вільного NO. Вивільнення NO зі сполук каталізується іонами металів змінної валентності, наприклад, іонами заліза та міді [24]. Довгий час вважалося, що основною реакцією між NO і оксигемоглобіном є реакція утворення нітрату:



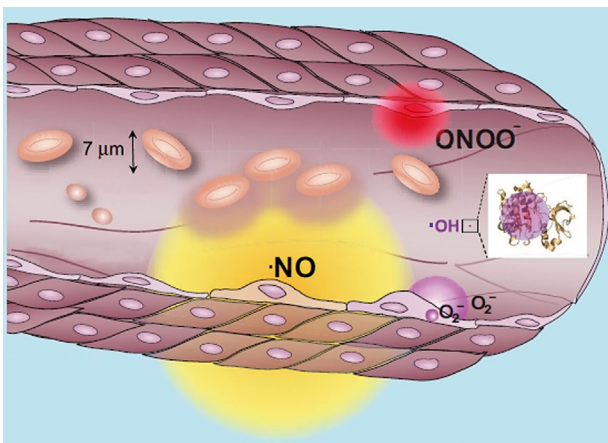
Проте останні дослідження вказують на те, що основною функцією гемоглобіну при взаємодії з NO є саме депонування. Дослідження показали, що NO з гемоглобіном може утворювати як S-нітрозогемоглобін (при взаємодії із Cys93 β-ланцюга), а з гемом – нітрозилгемоглобін. Таким чином, і гемоглобін, і нітрозильні комплекси негемового заліза утворюють великий пул NO в організмі [62].

У той же час •NO як радикал може легко вступати в реакцію з іншими радикалами, утворюючи нові радикали і виступаючи як оксидант, може і обривати вільнорадикальні процеси, виступаючи як антиоксидант, наприклад, у реакціях з радикалами ліпідів [45]. Основні ж патогенетичні властивості NO, як згадувалося вище, проявляються у здатності утворювати цитотоксичний пероксинітрит, із яким нині пов'язують розвиток патологічних ускладнень цілого ряду захворювань. Оскільки NO як вторинний посередник відіграє одну із ключових ролей у регуляції тону судин (і відповідно тиску крові), то незначні порушення його функціонування можуть також призводити до порушень у функціонуванні систем органів і організму в цілому. Так, NO може відігравати важливу роль у патогенезі цілого ряду серцево-судинних

захворювань, включаючи гіпертонічну хворобу й атеросклероз, у виникненні та розвитку діабету, деяких порушень периферичної нервової системи, у запальних та імунних процесах, у ряді інших захворювань [22, 56, 72].

### 3. Механізми нітрування білків

Висока швидкість взаємодії NO з киснем та іншими сполуками (зі супероксид-аніоном та іншими радикалами, іонами металів) [14, 15], а також висока проникна здатність NO і висока швидкість переміщення (~400 м/с) призводять до того, що конститутивні NO-синтази продукують NO в 10–40 разів більше, ніж це необхідно для нормального функціонування гуанілат-циклази (яке становить 5–10 нМ). Крім того, при взаємодії із дезоксигемоглобіном (який має афінність до NO в 1000 разів більше, ніж кисень) основна кількість NO елімінується і або запасується, або перетворюється в нітрати (див. попередній розділ). Молекула NO робить близько  $1 \times 10^9$  зіткнень (змін напрямків руху) за час свого півжиття (~1 с), і може перетнути межі клітини, де вона синтезувалася сотні тисяч разів [55]. Вважають, що за час півжиття молекули (~10–20 мс) вона може дифундувати на відстань кількох клітин (рис. 3). Тим не менше, незважаючи на вилучення NO при взаємодії з дезоксигемоглобіном, є великий його надлишок, особливо за умов виникнення запальних процесів, – наприклад при гіперглікемічно-індукованому зростанні вмісту AGEs. Тому  $\cdot\text{NO}$  може реагувати з іншими радикалами, які можуть бути присутні не обов'язково у клітині, де утворився сам оксид азоту, а в сусідніх клітинах. Так, показано, що зростання супероксид-аніона в 10 разів і зростання вмісту NO в 10 разів збільшує ймовірність утворення пероксинітриду в 100 разів [72]. Швидкість реакції  $\cdot\text{NO}$  з  $\cdot\text{O}_2^-$  дуже висока, обмежена лише швидкістю дифузії даних сполук і становить  $6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [15, 72, 73]. Пероксинітрид, порівняно з радикалами супероксид-аніона та гідроксилу, є більш стійким, тому має більшу вибірковість у своїх взаємодіях. Крім того, він за період свого півжиття може проникати в сусідні клітини через аніонні транспортери, чого не можуть робити зазначені радикали. Для порівняння: гідроксил-радикал є настільки активним, що діаметр його поширення (і відповідно реакцій) – не перевищує діаметра глобули білка середнього розміру (рис. 3). Вважають, що супероксид-аніон може поширюватись у межах клітини, де він виник. Саме завдяки своїй проникливості, вибірковості, особливо завдяки здатності модифікувати білки, взаємодіючи з їхніми тирозиновими залишками, ONOO<sup>-</sup> став оксидантом номер один у біологічних системах [72].

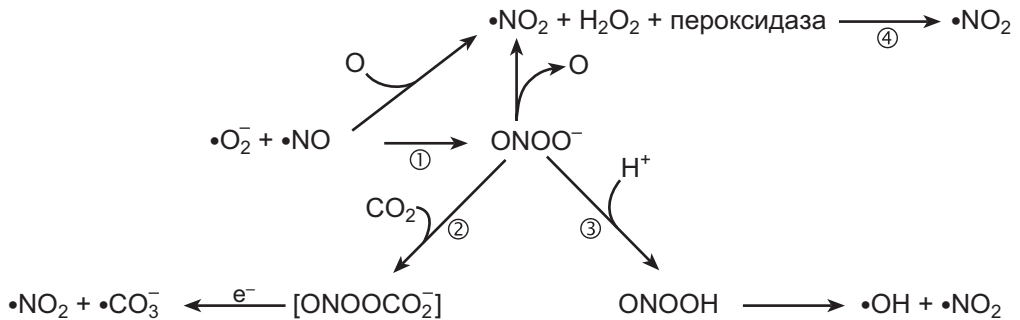
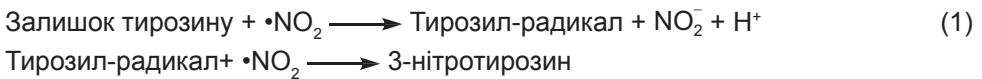


**Рис. 3.** Відстань, на яку можуть поширюватись оксид азоту, супероксид-аніон, гідроксил-радикал і пероксинітрид за період їхнього півжиття (показано на прикладі капіляра)

**Fig. 3.** The diffusion distance of nitric oxide, superoxide, hydroxyl radical and peroxyntirite, within their estimated half-lives (shown on capillary vessel)



Пероксинітри́т безпосередньо з залишками тирозину не реагує, але може брати участь в утворенні потужних білкових окисників і нітруючих агентів, у тому числі гідроксильного радикала ( $\bullet\text{OH}$ ) і  $\bullet\text{NO}_2$  - радикала діоксиду азоту (нітрогрупи) у результаті гомолітичного розриву в протонованих формах молекули  $\text{ONOO}^-$  – пероксинітри́тної кислоти ( $\text{ONOOH}$ ) (рис. 4) [4, 73]. Отримані радикали забирають водень з гідроксильної групи залишків тирозину, призводячи до утворення тирозил-радикала. До тирозил-радикала тоді приєднується діоксид азоту, що і призводить до утворення 3-нітротирозину (3-NT).



**Рис. 4.** Утворення пероксинітри́ту й основні механізми утворення радикала діоксиду азоту  $\bullet\text{NO}_2$ . 1 – утворення  $\text{ONOO}^-$  внаслідок взаємодії радикалів супероксид-аніона та оксиду азоту ( $\bullet\text{NO}$  і  $\bullet\text{O}_2^-$ ); 2, 3 – утворений пероксинітри́т у реакціях із кислотами Льюїса,  $\text{CO}_2$  і протонами за фізіологічних умов може привести до утворення  $\bullet\text{NO}_2$ ; 4 – за умов запальних процесів гемовмісні пероксидази активуються і каталізують утворення  $\bullet\text{NO}_2$  шляхом окиснення нітри́т-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) у присутності  $\text{H}_2\text{O}_2$

**Fig. 4.** The generations of peroxynitrite and nitrogen dioxide ( $\bullet\text{NO}_2$ ) radical (main mechanisms). 1 –  $\text{ONOO}^-$  is generated by the diffusioncontrolled reaction of  $\bullet\text{NO}$  and  $\bullet\text{O}_2^-$  radicals; 2, 3 – the generated  $\text{ONOO}^-$  can lead to oxidation with Lewis acids,  $\text{CO}_2$ , and protons under the physiological conditions, resulting in  $\bullet\text{NO}_2$  formation; 4 – under inflammatory conditions, heme peroxidases are activated and catalyze the oxidation of nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to form  $\bullet\text{NO}_2$

Оскільки  $\text{pK}_a$   $\text{ONOO}^-$  становить 6,8, то приблизно 20%  $\text{ONOO}^-$  стає протонованим з утворенням  $\text{ONOOH}$ , яка є більш нестійкою, ніж  $\text{ONOO}^-$  за фізіологічних значень pH [77]. Встановлено, що ініційоване протоном розщеплення  $\text{ONOO}^-$  є відносно повільним процесом, а це дає змогу пероксинітри́ту з більшою імовірністю реагувати з кислотами Льюїса, в тому числі  $\text{CO}_2$  й іонами металів, наприклад, у гемовмісних білках [32]. У результаті реакції  $\text{ONOO}^-$  з  $\text{CO}_2$  утворюється проміжний продукт – нітрузо-пероксокарбоксилат ( $\text{ONOOCO}_2^-$ ), який спонтанно розкладається на радикали карбонату ( $\bullet\text{CO}_3^-$ ) і діоксиду азоту ( $\bullet\text{NO}_2$ ) [7]. Радикал  $\bullet\text{CO}_3^-$  вважають більш цитотоксичним, ніж гідроксил-радикал за фізіологічних умов. Таким чином,  $\text{CO}_2$  може сприяти в патологічній участі пероксинітри́ту по нітруванню залишків тирозину білків за фізіологічних значень pH (рис. 4) [39].

Альтернативою до нітрування є нітрозилування – приєднання нітрозогрупи ( $\bullet\text{NO}$ ), яке також може відбуватися за залишками тирозину, точніше, за участю тирозил-радикала з утворенням 3-нітрозотирозину, який, у свою чергу, в результаті двохелектронного окиснення перетворюється до 3-нітротирозину (3-NT). Фор-

мування 3-нітрозотирозину є альтернативним механізмом, що приводить до утворення 3-нітротирозину, який спостерігається, як правило, у металовмісних протеїнах, наприклад, у цитохромі с, синтазі простагландин-ендопероксидази та ін. [18, 35, 88].

ONOO<sup>-</sup> не є єдиним джерелом утворення 3-NT за умов *in vivo*. Діоксид азоту, азотиста кислота, хлорид нітрилу (NO<sub>2</sub>Cl), в присутності ряду гемовмісних пероксидаз [9], отриманих із клітин за умов запального процесу, можуть індукувати нітрування залишків тирозину білків з формуванням 3-NT. Так, нітрит-аніон (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), який є первинним продуктом автооксидації •NO [51], далі окиснюється до утворення •NO<sub>2</sub>, у присутності ряду пероксидаз, наприклад мієлопероксидази, пероксидази еозинофілів і H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, з подальшим нітруванням залишків тирозину. Саме за таким механізмом відбувається пошкодження мікроорганізмів за участю нейтрофілів і макрофагів (рис. 4) [82].

Нітрування протеїнів по тирозину призводить до різких змін у структурі та функції протеїну через зміни в рK<sub>a</sub> гідроксильної групи тирозину від 10,1 до 7,2 [85]. Це призводить до надання залишку нітрованого тирозину негативного заряду за фізіологічних значень рН, таким чином змінюючи структурні властивості протеїнів, а у випадку ензимів – їхню каталітичну активність. Нітрування протеїнів по тирозину, а саме ковалентна модифікація фенольного кільця може також вплинути на процеси фосфорилування/дефосфорилування тирозину. Тому інтерес до нітротирозину є надзвичайно високим, особливо до дослідження його ролі за різних патологій [22, 31, 56]. Таким чином, білки, нітровані за залишками тирозину, можуть бути маркером формування пероксинітриду і, таким чином, свідчити про перебіг патологічних процесів, визначаючи рівень оксидативно-нітративного стресу.

Історично склалося, що спочатку нітрозативним стресом характеризували усі процеси за участю азотовмісних сполук, яким приписували шкідливі функції, хоча насправді даний процес характеризує утворення нітрозосполук (нітрозотіолів і нітросоамінів). Дослідження утворення насамперед нітротирозину (процес нітрування) і його патологічної ролі в організмі якраз вказують на те, що відбувається саме нітративний стрес, який найбільше стосується оксидативних процесів у клітині, і саме даний термін є істинним для характеристики патологічних процесів за участю NO [72]. На даний момент учені використовують обидва терміни для характеристики патологічних процесів за участю NO.

#### 4. Біологічні мішені пероксинітриду, нітративний стрес за умов цукрового діабету

Нітративний стрес (нітрування протеїнів за залишками тирозину) був ідентифікований принаймні для 50 захворювань людини і більш ніж у 80 різних захворюваннях, змодельованих на тваринах [40]. Ці показники безперервно збільшуються. Проте виявлення нітрування білків на даний момент не обов'язково прямо виявляє їхню патогенну роль, – воно може бути пов'язане зі збільшенням формування пероксинітриду разом з іншими активними формами азоту за умов виникнення та розвитку відповідного захворювання.

Свою патогенетичну роль пероксинітрит може виявляти не тільки модифікуванню властивостей білків, але і взаємодією з ліпідами та ДНК.

Крім можливості зупиняти перекисне окиснення ліпідів, ONOO<sup>-</sup> може його ініціювати, взаємодіючи з ненасиченими зв'язками ліпідів мембран, ліпосом і ліпопротеїнів. У результаті таких реакцій можуть утворюватися радикали гідроперекисів ліпідів, дієнові кон'югати, альдегіди [23]. Таким чином, утворені радикали можуть іні-

ціювати подальші uszkodження мембранних ліпідів, з втратою ними біологічних властивостей, втратою текучості мембран, з чим пов'язують процеси демієлінізації аксонів при виникненні діабетичних нейропатій [83]. Крім того, при таких взаємодіях (ONOO<sup>-</sup> з ліпідами) можуть утворюватися різні нітровані ліпіди з потенційними біологічними властивостями трансдукції сигналу, з певними фізіологічними і патологічними властивостями, а також можуть утворюватися проміжні продукти (ізопростани, 4-гідроксисинонел), які викликають вторинні окиснювальні реакції [3].

При взаємодії з ДНК (а ONOO<sup>-</sup> легко може проникати в ядро клітини) можуть відбуватися окиснювальні реакції як з азотистими основами, так і з дезоксирибозними залишками, в результаті чого можуть утворюватися різного роду мутації, з можливістю виникнення злоякісних перероджень, та односторонніх розривів [17]. Саме односторонні розриви ДНК пов'язують із основною цитотоксичною функцією пероксинітриду при взаємодії з ДНК, оскільки при цьому активується ядерний ензим PARP, який залучений у репарацію таких uszkodжень [89], що призводить до значного зменшення енергоресурсів клітини. За умов діабету PARP може надактивуватися, що призводить до критичного зменшення енергетичних запасів клітини і може призвести до апоптозу чи некрозу [42]. Таким чином, рівень активності PARP може слугувати ще одним маркером патологічних змін у клітині. Дослідження механізмів функціонування нітративного стресу і ролі PARP дало змогу присвоїти їй статус молекулярного перемикача між апоптозом і некрозом [8].

У той же час модифікація білків шляхом нітрування на рівні цілої клітини має набагато ширший ефект, ніж спочатку було прийнято вважати. Перші дослідження патофізіологічної ролі пероксинітриду пов'язували зі здатністю інгібувати біологічну функцію сигнальних протеїнів, і для певних механізмів воно дійсно справджується. Так, утворення нітротирозину і нітрування ряду білків у тромбоцитах призводить до інгібування фосфорилування рецепторів до тромбіну, і до запобігання їхньої активації на відповідний стимул 795; нітрування Т-клітинного рецептора (TCR)/CD3 комплексу призводить до інгібування проліферативної відповіді Т-лімфоцитів [10].

Однак сучасні дослідження виявили також велику групу різних протеїнів, модифікація яких призводила до їхнього активування. Крім того, активація чи інгібування таких протеїнів не лише викликала біологічні зміни даних молекул, що також мало місце, але і впливала на сигнальні шляхи, що призводило до широкого спектру змін у функціонуванні цілої клітини чи органа.

Наприклад, було виявлено, що ONOO<sup>-</sup> може активувати білок смуги 3 у людських еритроцитах, що призводило до активації гліколізу, при досить низьких значеннях вмісту нітротирозину, тоді як його збільшення мало наслідком інгібування гліколізу [58]. Нітрування ряду рецепторних тирозинових кіназ до факторів росту (епітеліального, тромбоцитарного) призводило до активації їхніх ефекторних ланок, наприклад, сигнального шляху фосфатидилінозитол-3'-кіназа/протеїн кіназа В (PI3K/Akt) [52]. Активація або інгібування сигнального шляху PI3K/Akt у різного типу клітин може призводити до активації анти- або проапоптичних механізмів [30]. Було також виявлено активацію усіх трьох кіназ, які активуються у відповідь на мітоген (MAPKs) – ERK, JNK, і p38, що призводило до активації цілого ряду сигнальних молекул, активації апоптичних механізмів, індукції експресії ряду генів, до підвищення адгезивності клітин та ін. залежно від типу клітин. Виявлено також активацію РКС, ядерного фактора-κВ (NF-κB), зміни у будові й організації цитоскелетних білків і цілого ряду інших порушень, які для кожного окремого типу захворювання й типу клітин/тканин виражаються по-своєму [72].

За умов цукрового діабету найважливішими патологічними діями є здатність нітротирозину моделювати (послаблювати) енергетичний баланс клітини, активувати PKC та NF-κB і опосередковано активувати PARP. Так, основні протеїни, які модифікуються за дії нітротирозину при гіперглікемії, представлені в таблиці. Патологічні механізми активації PKC та PARP, як описано вище, можуть призводити до посилення судинної дисфункції та втрати енергетичного балансу клітини. NF-κB може спричиняти активацію iNOS, що, у свою чергу, може призводити до посилення утворення NO і пероксинітриту за умов цукрового діабету [21]. На клітинному/тканинному рівні за умов цукрового діабету рівень ушкоджень, особливо на ранніх етапах їх виникнення, можна спостерігати по загальному вмісту нітрованих і полі-ADP-рибозильованих білків [72].

Так, нашими дослідженнями, проведеними з використанням тваринних моделей 1-го і 2-го типів діабету і різних інтервалів захворювання, було виявлено, що вміст нітротирозину за умов цукрового діабету зростає на 30–120% у сідничному нерві, на 25–60% у дорсальних спинномозкових гангліях, на 25–50% у спинному мозку, на 50–110% у нирках, 40–150% у сітківці ока порівняно з контролем [25, 26, 28, 29, 70]. Нами було також виявлено взаємозалежність між активацією та інгібуванням PARP і відповідним розвитком та інгібуванням нітративного стресу, і навпаки. Також було показано значний корегуючий вплив інгібіторів PARP і сполук, які розщеплювали пероксинітрит у діабетичних тварин, на фізіологічні та біохімічні показники [26, 27, 71].

## ВИСНОВКИ

Порушення в електронтранспортному ланцюзі мітохондрій при гіперглікемії є основним механізмом виникнення оксидативно-нітративного стресу, який лежить в основі виникнення і розвитку хронічних діабетичних ускладнень. Зростання вмісту супероксид-аніону за умов гіперглікемії, а також здатність його при взаємодії з NO утворювати цитотоксичний пероксинітрит, призводить до множинних патологічних змін у функціонуванні сигнальних і метаболічних шляхів, до порушень гомеостазу клітин і органів за умов цукрового діабету. Активація PARP у результаті пошкодження ДНК пероксинітритом, разом із високим вмістом глюкози призводить до активації поліольного і гексозамінного шляхів, накопичення продуктів і попередників неензиматичного глікозилювання, активації PKC. Дані порушення призводять до значного посилення неензиматичного глікозилювання, порушення багатьох біохімічних і фізіологічних параметрів, збіднення клітин на ендогенні антиоксиданти, а також посилює запальні процеси із залученням імунокомпетентних клітин, що, в кінцевому результаті, значно посилюють оксидативно-нітративний стрес, який викликає патологічні зміни у клітині, формуючи таким чином „порочне коло” із наростаючими шкідливими змінами. Детальне вивчення механізмів виникнення та розвитку діабетичних ускладнень є актуальною проблемою, оскільки дає змогу виявити можливі молекулярні механізми впливу на дані процеси з метою запобігання їхньому виникненню та розвитку, також у створенні нових діагностичних/прогностичних підходів. Так, одним із перспективних напрямів лікування діабетичних порушень може бути створення препаратів, які б специфічно інгібували PARP і розщеплювали пероксинітрит.

**Таблиця.** Основні протеїни, які за участю пероксинітриду зазнають нітрування за тирозиновими залишками при виникненні гіперглікемії за цукрового діабету

**Table.** Peroxynitrite mediated protein tyrosine modification under the hyperglycemia of diabetes mellitus

Білок	Біологічні зміни, спричинені нітруванням
Інсулін	Зниження спорідненості до інсуліну, виникнення резистентності [19].
Субстрат інсулінового рецептора-1 (IRS1)	Зниження вмісту у клітині, інактивація, виникнення резистентності до інсуліну [68].
PI3-кіназа	Зниження рівня фосфорилування Akt-кінази, збільшення рівня апоптозу ендотеліальних клітин, їх дисфункція [52].
Гліцеринальдегід-3-фосфат дегідрогеназа	Зниження гліколізу, збіднення енергоресурсів клітини [16].
eNOS	(Шляхом нітросилування) Ендотеліальні дисфункції [97].
Mn-SOD	Зниження активності, збільшення утворення пероксинітриду в мітохондріях [53].
Кетокислота-CoA-трансфераза	Зміна метаболізму кетонів тіл [59].
NADH-дегідрогеназа	(Комплекс I) Послаблення клітинного енергетичного балансу [12].
Сукцинат дегідрогеназа	(Комплекс II) Послаблення клітинного енергетичного балансу [79].
Цитохром с редуктаза	(Комплекс III) Послаблення клітинного енергетичного балансу [41].
АТФ-синтаза	(Комплекс V) Послаблення клітинного енергетичного балансу [77].
Цитохром с	Послаблення клітинного енергетичного балансу, збільшення оксидативного стресу в мітохондрії [46].
Аконітаза	(Шляхом нітросилування) послаблення клітинного енергетичного балансу [43].
Аденін-нуклеотид транслоказа	Відкриття мітохондріальних транзитних мегаканалів, апоптоз [93].
Нікотинамід нуклеотид трансгідрогеназа	Зниження вмісту NADPH, зниження швидкості регенерації GSH [33].
Актин	Зменшення рівня полімеризації, цитоскелетна дезорганізація, ендотеліальні дисфункції, зниження функції нейтрофілів [63].
Кислий фібрилярний білок глії (GFAP)	Структурні зміни в астроцитах і Шванівських клітинах [37].
Гістони (H2B, H3 і H4)	Зміни в організації ДНК, може призводити до генних мутацій, раку [44].
Фібриноген	Послаблення гомеостазу, коагуляційні порушення [64].
Ліпопротеїни великої густини	Включення в атеросклерозні бляшки [74].
Ліпопротеїни низької густини	Індукція включення окисненого холестеролу в стінки артерій [90].
Плазміноген	Зниження фібринолітичної активності [69].

1. Akizuki E., Akaike T., Okamoto S. et al. Role of NO and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 2000; 225(2): 151–159.
2. Atkins R.C., Zimmet P. Diabetic kidney disease: act now or pay later. **Saudi. J. Kidney Dis. Transpl.**, 2010; 21(2): 217–221.
3. Baker P.R., Schopfer F.J., Sweeney S., Freeman B.A. Red cell membrane and plasma linoleic acid nitration products: synthesis, clinical identification, and quantitation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2004; 101 (32): 11577–11582.
4. Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1990; 87(4), 1620–1624.
5. Beckman J.S., Koppenol W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am. J. Physiol.**, 1996; 271(5 Pt 1): C1424–1437.
6. Bishop A., Anderson J.E. NO signaling in the CNS: from the physiological to the pathological. **Toxicology**, 2005; 208(2): 193–205.
7. Bonini M.G., Radi R., Ferrer-Sueta G. et al. Direct EPR detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. **J. Biol. Chem.**, 1999; 274(16): 10802–10806.
8. Boulares A.H., Yakovlev A.G., Ivanova V. et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. **J. Biol. Chem.**, 1999; 274(33): 22932–22940.
9. Brennan M.L., Wu W., Fu X. et al. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. **J. Biol. Chem.**, 2002; 277(20): 17415–17427.
10. Brito C., Naviliat M., Tiscornia A.C. et al. Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. **J. Immunol.**, 1999; 162(6): 3356–3366.
11. Brown G.C. Nitric oxide and mitochondria. **Front. Biosci.**, 2007; 12: 1024–1033.
12. Brown G.C., Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. **Biochim. Biophys. Acta**, 2004; 1658(1–2): 44–49.
13. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, 2005; 54(6): 1615–1625.
14. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. **Mol. Aspects Med.**, 2005; 26 (1–2): 3–31.
15. Brüne B., Zhou J. Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. **Cardiovasc. Res.**, 2007; 75(2): 275–282.
16. Buchczyk D.P., Grune T., Sies H., Klotz L.O. Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome. **J. Biol. Chem.**, 2003; 278(2): 237–241.
17. Burney S., Caulfield J.L., Niles J.C. et al. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. **Mutat. Res.**, 1999; 424 (1–2): 37–49.
18. Chen Y.R., Chen C.L., Chen W. et al. Formation of protein tyrosine ortho-semiquinone radical and nitrotyrosine from cytochrome c-derived tyrosyl radical. **J. Biol. Chem.**, 2004; 279(17): 18054–18062.
19. Chi Q., Wang T., Huang K. Effect of insulin nitration by peroxynitrite on its biological activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2005; 330(3): 791–796.
20. Cole A.R., Astell A., Green C., Sutherland C. Molecular connexions between dementia and diabetes. **Neurosci. Biobehav.**, 2007; 31(7): 1046–1063.
21. Cosentino F., Hishikawa K., Katusic Z.S., Luscher T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. **Circulation**, 1997; 96(1): 25–28.
22. Crosswhite P., Sun Z. Nitric oxide, oxidative stress and inflammation in pulmonary arterial hypertension. **J. Hypertens.**, 2010; 28(2): 201–212.
23. Denicola A., Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. **Toxicology**, 2005; 208(2): 273–288.

24. Dicks A.P., Williams D.L. Generation of nitric oxide from S-nitrosothiols using protein-bound Cu<sup>2+</sup> sources. **Chem. Biol.** 1996; 3(8): 655–659.
25. Drel V.R., Mashtalir N., Ilynska O. et al. The leptin-deficient (ob/ob) mouse: a new animal model of peripheral neuropathy of type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, 2006; 55(12): 3335–3343.
26. Drel V.R., Pacher P., Varenjuk I. et al. Evaluation of the peroxynitrite decomposition catalyst Fe(III) tetra-mesitylporphyrin octasulfonate on peripheral neuropathy in a mouse model of type 1 diabetes. **Int. J. Mol. Med.** 2007; 20(6): 783–792.
27. Drel V.R., Pacher P., Varenjuk I. et al. A peroxynitrite decomposition catalyst counteracts sensory neuropathy in streptozotocin-diabetic mice. **Eur. J. Pharmacol.** 2007; 569(1–2): 48–58.
28. Drel V.R., Xu W., Zhang J. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 2009; 50(4): 1778–1790.
29. Drel V.R., Xu W., Zhang J. et al. Poly(Adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase inhibition counteracts multiple manifestations of experimental type 1 diabetic nephropathy. **Endocrinology**, 2009; 150(12): 5273–5283.
30. El-Remessy A.B., Bartoli M., Platt D.H. et al. Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. **J. Cell Sci.** 2005; 118(Pt. 1): 243–252.
31. Eu J.P., Liu L., Zeng M., Stamler, J.S. An apoptotic model for nitrosative stress. **Biochemistry**, 2000; 39(5): 1040–1047.
32. Ferrer-Sueta G., Quijano C., Alvarez B., Radi R. Reactions of manganese porphyrins and manganese-superoxide dismutase with peroxynitrite. **Methods Enzymol.** 2002; 349: 23–37.
33. Forsmark-Andree P., Persson B., Radi R. et al. Oxidative modification of nicotinamide nucleotide transhydrogenase in submitochondrial particles: effect of endogenous ubiquinol. **Arch. Biochem. Biophys.** 1996; 336(1): 113–120.
34. Geller D.A., Billiar T.R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Rev.** 1998; 17(1): 7–23.
35. Goodwin D.C., Gunther M. R., Hsi L. C. et al. Nitric oxide trapping of tyrosyl radicals generated during prostaglandin endoperoxide synthase turnover. Detection of the radical derivative of tyrosine 385. **J. Biol. Chem.** 1998; 273(15): 8903–8909.
36. Gorbunov N.V., Osipov A.N., Day B.W. et al. Reduction of ferrylmyoglobin and ferrylhemoglobin by nitric oxide: a protective mechanism against ferryl hemoprotein-induced oxidations. **Biochemistry**, 1995; 34(20): 6689–6699.
37. Gorg B., Bidmon H.J., Keitel V. et al. Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. **Arch. Biochem. Biophys.** 2006; 449(1–2): 104–114.
38. Govers R., Coster A.C., James D.E. Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. **Mol. Cell. Biol.** 2004; 24(14): 6456–6466.
39. Gow A., Duran D., Thom S.R., Ischiropoulos H. Carbon dioxide enhancement of peroxynitrite-mediated protein tyrosine nitration. **Arch. Biochem. Biophys.** 1996; 333(1): 42–48.
40. Greenacre S.A., Ischiropoulos H. Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. **Free Radic. Res.** 2001; 34(6): 541–581.
41. Guidarelli A., Fiorani M., Cantoni O. Enhancing effects of intracellular ascorbic acid on peroxynitrite-induced U937 cell death are mediated by mitochondrial events resulting in enhanced sensitivity to peroxynitrite-dependent inhibition of complex III and formation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.** 2004; 378(Pt. 3): 959–966.
42. Ha H.C., Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1999; 96(24): 13978–13982.
43. Han D., Canali R., Garcia J. et al. Sites and mechanisms of aconitase inactivation by peroxynitrite: modulation by citrate and glutathione. **Biochemistry**, 2005; 44(36): 11986–11996.
44. Haqqani A.S., Kelly J.F., Birnboim H.C. Selective nitration of histone tyrosine residues *in vivo* in mutatact tumors. **J. Biol. Chem.** 2002; 277(5): 3614–3621.
45. Hogg N., Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, 1999; 1411(2–3): 378–384.
46. Jang B., Han S. Biochemical properties of cytochrome c nitrated by peroxynitrite. **Biochimie**, 2006; 88(1): 53–58.

47. Jansson E.A., Huang L., Malkey R. et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nat. Chem. Biol.**, 2008; 4(7): 411–417.
48. Kelm M., Feelisch M., Deussen A. et al. Release of endothelium derived nitric oxide in relation to pressure and flow. **Cardiovasc. Res.**, 1991; 25(10): 831–836.
49. Kim P.K., Kwon Y.G., Chung H.T., Kim Y.M. Regulation of caspases by nitric oxide. **Ann. N Y Acad. Sci.**, 2002; 962: 42–52.
50. King H., Aubert R.E., Herman W.H. Global burden of diabetes, 1995–2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, 1998; 21(9): 1414–1431.
51. Klebanoff S.J. Reactive nitrogen intermediates and antimicrobial activity: role of nitrite. **Free. Radic. Biol. Med.**, 1993; 14(4): 351–360.
52. Klotz L.O., Schieke S.M., Sies H., Holbrook N.J. Peroxynitrite activates the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in human skin primary fibroblasts. **Biochem. J.**, 2000; 352(Pt. 1): 219–225.
53. Knight T.R., Kurtz A., Bajt M.L. et al. Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity: role of mitochondrial oxidant stress. **Toxicol. Sci.**, 2001; 62(2): 212–220.
54. Kosenko E., Llansola M., Montoliu C. et al. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. **Neurochem. Int.**, 2003; 43(4–5): 493–499.
55. Lancaster J.R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1994; 91(17): 8137–8141.
56. Lee J.R., Kim J.K., Lee S.J., Kim K.P. Role of protein tyrosine nitration in neurodegenerative diseases and atherosclerosis. **Arch. Pharm. Res.**, 2009; 32(8): 1109–1118.
57. Leone A.M., Palmer R.M., Knowles R.G. et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. **J. Biol. Chem.**, 1991; 266(35): 23790–23795.
58. Mallozzi C., Di Stasi A.M., Minetti M. Peroxynitrite modulates tyrosine-dependent signal transduction pathway of human erythrocyte band 3. **FASEB J.**, 1997; 11(14): 1281–1290.
59. Marcondes S., Turko I.V., Murad F. Nitration of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase in rats after endotoxin administration. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 2001; 98(13): 7146–7151.
60. Martyn J.A., Kaneki M., Yasuhara S. Obesity-induced insulin resistance and hyperglycemia: etiologic factors and molecular mechanisms. **Anesthesiology**, 2008; 109(1): 137–148.
61. Merriman-Smith B.R., Krushinsky A., Kistler J., Donaldson P.J. Expression patterns for glucose transporters GLUT1 and GLUT3 in the normal rat lens and in models of diabetic cataract. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, 2003; 44(8): 3458–3466.
62. Mülsch A., Mordvintsev P.I., Vanin A.F., Busse R. Formation and release of dinitrosyl iron complexes by endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1993; 196(3): 1303–1308.
63. Neumann P., Gertzberg N., Vaughan E. et al. Peroxynitrite mediates TNF-induced endothelial barrier dysfunction and nitration of actin. **Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.**, 2006; 290(4): L674–L684.
64. Nielsen V.G., Crow J.P., Mogal A. et al. Peroxynitrite decreases hemostasis in human plasma in vitro. **Anesth. Analg.**, 2004; 99(1): 21–26.
65. Nishikawa T., Edelstein D., Du X.L. et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, 2000; 404(6779): 787–790.
66. Nogueira-Machado J.A., Chaves M.M. From hyperglycemia to AGE-RAGE interaction on the cell surface: a dangerous metabolic route for diabetic patients. **Expert. Opin. Ther. Targets**, 2008; 12(7): 871–82.
67. Nohl H., Staniek K., Kozlov A.V. The existence and significance of a mitochondrial nitrite reductase. **Redox Rep.**, 2005; 10(6): 281–286.
68. Nomiya T., Igarashi Y., Taka H. et al. Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 2004; 320(3): 639–647.
69. Nowak P., Kolodziejczyk J., Wachowicz B. Peroxynitrite and fibrinolytic system: the effect of peroxynitrite on plasmin activity. **Mol. Cell Biochem.**, 2004; 267(1–2): 141–146.
70. Obrosova I.G., Drel V.R., Oltman C.L. et al. Role of nitrosative stress in early neuropathy and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, 2007; 293(6): E1645–55.



71. *Obrosova I.G., Drel V.R., Pacher P.* et al. Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited. **Diabetes**, 2005; 54 (12): 3435–3441.
72. *Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol. Rev.**, 2007; 87(1): 315–424.
73. *Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ullrich J.* et al. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. **Free Radic. Biol. Med.**, 2000; 28(12): 1780–1794.
74. *Pennathur S., Bergt C., Shao B.* et al. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. **J. Biol. Chem.**, 2004; 279(41): 42977–42983.
75. *Pufahl R.A., Singer C.P., Peariso K.L.* et al. Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. **Science**, 1997; 278(5339): 853–856.
76. *Radi R., Beckman J.S., Bush K.M., Freeman B.A.* Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 1991(7): 266, 4244–4250.
77. *Radi R., Cassina A., Hodara R.* et al. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radic. Biol. Med.**, 2002; 33(11): 1451–1464.
78. *Rees M.D., Kennett E.C., Whitelock J.M., Davies M.J.* Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies. **Free Radic. Biol. Med.**, 2008; 44(12): 1973–2001.
79. *Rubbo H., Denicola A., Radi R.* Peroxynitrite inactivates thiolcontaining enzymes of *Trypanosoma cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. **Arch. Biochem. Biophys.**, 1994; 308(1): 96–102.
80. *Samouilov A., Kuppasamy P., Zweier J.L.* Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. **Arch. Biochem. Biophys.**, 1998; 357(1): 1–7.
81. *Schmitz H.D.* Reversible nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase upon serum depletion. **Eur. J. Cell. Biol.**, 2001; 80 (6): 419–427.
82. *Shao B., Bergt C., Fu X.* et al. Tyrosine 192 in apolipoprotein A-I is the major site of nitration and chlorination by myeloperoxidase, but only chlorination markedly impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. **J. Biol. Chem.**, 2005; 280(7): 5983–5993.
83. *Shi H., Noguchi N., Xu Y., Niki E.* Formation of phospholipid hydroperoxides and its inhibition by alpha-tocopherol in rat brain synaptosomes induced by peroxynitrite. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1999; 257(3): 651–656.
84. *Shinohara M.* Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. **J. Clin. Invest.**, 1998; 101(5): 1142–1147.
85. *Sokolovsky M., Riordan J.F., Vallee B.L.* Conversion of 3-nitrotyrosine to 3-aminotyrosine in peptides and proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 1967; 27(1): 20–25.
86. *Stamler J.S.* S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis. **Circ. Res.**, 2004; 94(4): 414–417.
87. *Stone J.R., Marletta M.A.* Spectral and kinetic studies on the activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide. **Biochemistry**, 1996; 35(4): 1093–1099.
88. *Sturgeon B.E., Glover R.E., Chen Y.R.* et al. Tyrosine iminoxyl radical formation from tyrosyl radical/nitric oxide and nitrosotyrosine. **J. Biol. Chem.**, 2001; 276(49): 45516–45521.
89. *Szabo C., Zingarelli B., O'Connor M., Salzman A.L.* DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1996; 93(5): 1753–1758.
90. *Trostchansky A., Ferrer-Sueta G., Batthyany C.* et al. Peroxynitrite flux-mediated LDL oxidation is inhibited by manganese porphyrins in the presence of uric acid. **Free Radic. Biol. Med.**, 2003; 35(10): 1293–1300.
91. *Trumpower B.L.* The protonmotive Q cycle: energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc1 complex. **J. Biol. Chem.**, 1990; 265(20): 11409–11412.
92. *Vanin A.F.* Dinitrosyl iron complexes with thiolate ligands: physico-chemistry, biochemistry and physiology. **Nitric Oxide**, 2009; 21(1): 1–13.

93. *Vieira H.L., Belzacq A.S., Haouzi D. et al.* The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, 4-hydroxynonenal. **Oncogene**, 2001; 20(32): 4305–4316.
94. *Wallace D.C.* Diseases of the mitochondrial DNA. **Annu. Rev. Biochem**, 1992; 61: 1175–1212.
95. *Wilkinson-Berka J.L., Miller A.G.* Update on the treatment of diabetic retinopathy. **Scientific World Journal**, 2008; 8: 98–120.
96. *Zhang Y., Hogg N.* S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. **Free Radic. Biol. Med**, 2005; 38(7): 831–838.
97. *Zou M.H., Cohen R., Ullrich V.* Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Endothelium**, 2004; 11(2): 89–97.

---

## MAIN MECHANISMS OF THE INITIATION AND DEVELOPMENT OF DIABETIC COMPLICATIONS: THE ROLE OF NITRATIVE STRESS

**V. R. Drel**

*Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine*

In the review described the main mechanisms of the oxidative stress initiation in the mitochondria electron-transport chain under the hyperglycaemia condition. It is described the main metabolic and signal-transduction mechanisms, activation of which takes place under the chronic diabetic complications, and which leads to the increase of oxidative stress. It is analysed in detail the role of nitric oxide in the biological systems and its properties under the condition of oxidative stress, especially under the diabetes mellitus. The results of the main biological targets for the peroxynitrite and the molecular markers of the diabetic complications were summarized.

**Key words:** diabetes mellitus, glycosylation, peroxynitrite, oxidative-nitrative stress, poly-ADP-ribosylation.

## ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И РАЗВИТИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЙ: РОЛЬ НИТРАТИВНОГО СТРЕССА

**В. Р. Дрель**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко  
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина*

В обзоре рассмотрен основной механизм возникновения оксидативного стресса при участии электронтранспортной цепи митохондрий при гипергликемии. Описаны основные метаболические и сигнальные механизмы, активация которых имеет место при хронических диабетических заболеваниях и которые ведут к усилению оксидативного стресса. Детально проанализирована роль оксида азота в биологических системах, а также условия, при которых имеет место оксидативно-нитративный стресс, в частности, при сахарном диабете. Обобщены результаты исследований относительно биологических мишеней пероксинитрита, а также основных молекулярных маркеров диабетических заболеваний.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, гликозилирование, пероксинитрит, оксидативно-нитративный стресс, поли-ADP-рибозилирование.

Одержано: 15.06.2010