УДК [577.122.3:612.35]:613.2-025.17 *https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.141*

ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЧНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА ЦИСТЕЇНУ В ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ НУТРІТИВНОГО ДИСБАЛАНСУ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. НИКОЛАЙЧУК, Ю. А. КАЛЮЖНА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: i.nykolaichuk@chnu.edu.ua

Робота присвячена дослідженню концентрації гомоцистеїну в плазмі крові та активності ензимів катаболічних перетворень цистеїну – γ-глутамілцистеїнлігази та цистеїндиоксигенази у гепатоцитах щурів за умов споживання надмірного вмісту сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну. Впродовж експерименту тварини споживали напівсинтетичний раціон відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології за принципом парного харчування з урахуванням кількості харчового протеїну та сахарози в перерахунку на кілограм дієти. Концентрацію гомоцистеїну в зразках плазми крові визначали імунохімічним методом із електрохемілюмінесцентною детекцією (ECLIA). Рівень цистеїну оцінювали колориметричним методом при взаємодії з кислотним нінгідриновим реагентом. Активність γ-глутамілцистеїнлігази визначали за вмістом неорганічного фосфору (Pi) внаслідок гідролізу АТР в реакційній суміші. Активність цистеїндиоксигенази досліджували за зменшенням вмісту цистеїну в реакційній суміші.

Встановлено, що споживання тваринами високосахарозного раціону супроводжується підвищенням концентрації гомоцистеїну в плазмі крові на 57 % порівняно з контролем, тоді як надходження надлишку даного вуглеводу за умов нестачі протеїну призводить до розвитку гіпогомоцистеїнемії (знижується на 43 % порівняно зі значеннями контрольної групи тварин). Підвищений рівень гомоцистеїну в плазмі крові при споживанні надлишку сахарози можна розглядати як прогностичний маркер функціональних порушень шляху транссульфування в печінці та використовувати в діагностиці гепатопатологій. Оскільки за умов споживання високосахарозного раціону в клітинах печінки відбувається зростання вмісту цистеїну та активності γ-глутамілцистеїнсинтетази – ключового ензиму синтезу глутатіону, що, ймовірно, спрямовано на підтримання внутрішньоклітинних резервів даного трипептиду. Отримані нами дані щодо виникнення гіпогомоцистеїнемії за умов споживання надмірної кількості легкодоступного вуглеводу на тлі нестачі харчового протеїну висвітлюють прогалини в розумінні кореляції між обмінними процесами метіоніну, гомоцистеїну та цистеїну в печінці. При надмірному споживанні сахарози на тлі протеїнової недостатності ключовим чинником зниження активності γ-глутамілцистеїнсинтетази (на 36 %) та субстрату даної реакції – цистеїну – можна розглядати нестачу екзогенного протеїну, оскільки зменшується не лише кількість надходження даної амінокислоти, а й порушується її синтез із метіоніну. Водночас максимальне підвищення цистеїндиоксигеназної активності в гепатоцитах щурів за умов споживання високосахарозного/низькопротеїнового раціону на тлі зниження γ-ГЦС активності вказує на утилізацією надлишку цистеїну з утворенням таурину та сульфатів.

Ключові слова: гомоцистеїн, цистеїн, γ-глутамілцистеїнлігаза, цистеїндиоксигеназа, гепатоцити, аліментарна депривація протеїну, високосахарозний раціон

Вступ. Останні десятиріччя характеризуються стрімким збільшенням патологій гомеостатичних органів, які розвиваються на тлі нутрітивного дисбалансу харчових раціонів (Sellmann et al., 2017). Високий ступінь споживання легкозасвоюваних вуглеводів (сахарози, фруктози тощо) за умов аліментарної депривації протеїну часто призводить до функціональної недостатності органів (Burchfield et al., 2018, Rasool et al., 2018).

Нестача харчового протеїну, як правило, супроводжується розвитком ендогенної протеїно-енергетичної недостатності (Копильчук та ін., 2015) та призводить до виснаження внутрішньоклітинного пулу амінокислот (Kopylchuk et al., 2020).

В останні роки наводяться численні факти про причетність порушень метаболізму сульфуровмісних амінокислот – метіоніну, цистеїну та гомоцистеїну (ГЦ) – до розвитку низки захворювань (Jung, 2015; Djuric, 2018). Дані амінокислоти мають спільні шляхи деградації, а їх інтермедіати відіграють роль регуляторів активності ензимів реметилювання та транссульфування гомоцистеїну (Karmin et al., 2018).

Реметилювання ГЦ в пецінці відбувається в ході реакцій метіонінового циклу, який завершується регенерацією метіоніну шляхом використання 5-метилтетрагідрофолату чи бетаїну, що виступають донорами метильної групи. Інший шлях метаболізму відбувається через транссульфування, коли з ГЦ утворюється цистеїн, який бере участь у синтезі протеїну, таурину, гідроген сульфату та глутатіону (Hashimoto et al., 2007). Шлях трансульфування

відіграє значущу роль в усуненні потенційно небезпечного надлишку гомоцистеїну і за деякими даними значно вливає на його катаболізм у плазмі крові (змінює майже 78 %), тоді як перетворення ГЦ на метіонін забезпечує утилізацію лише 2 % цієї сполуки (Škovierová et al., 2017).

Незважаючи на те, що роль гомоцистеїну в біохімічних процесах обговорюється досить давно, основні публікації про зв'язок підвищеного вмісту ГЦ з патологічними станами з'явилися в останні роки (Karmin et al., 2018; Qureshi et al., 2019). Відомо, що збільшення вмісту ГЦ у крові викликає дисбаланс між шляхами його продукування та утилізації. При цьому рівень гомоцистеїну розглядається як патогенний чинник, який може призводити до розвитку гіпергомоцистеїнемії, що підтверджується результатами наших попередніх досліджень за умов нестачі харчового протеїну (Копильчук та ін., 2015).

На шляху транссульфування гомоцистеїн опосередковано пов'язаний із окисно-відновним потенціалом клітини та процесами детоксикації через амінокислоту цистеїн, оскільки її катаболізм відбувається двома шляхами: за участю γ-глутамілцистеїнлігази (КФ 6.3.2.2, γ-ГЦЛ) та цистеїндиоксигенази (КФ 1.13.11.20, ЦДО) (Оболенська та ін., 2011).

γ-ГЦС – ключовий ензим синтезу глутатіону, задіяний в γ-глутамільному циклі. ЦДО сприяє окисленню SH-групи цистеїну з утворенням цистеїносульфінату, частина якого перетворюється до таурину або ж в реакції трансамінування за участю цистеїнсульфінатамінотрансферази трансформується в β-сульфінілпіруват з подальшим розщепленням до пірувату та сульфатів (Нечипорук та ін., 2017).

У зв'язку з цим причетність порушень метаболізму сульфуровмісних амінокислот до розвитку багатьох патологічних станів не викликає сумнівів, проте питання, як змінюється стан ензиматичних систем катаболізму цистеїну в клітинах печінки та концентрація гомоцистеїну в крові за умов надмірного споживання легкодоступних вуглеводів та дефіциту харчового протеїну залишається відкритим.

Мета роботи – дослідження вмісту цистеїну та активності ключових ензимів його катаболізму – γ-глутамілцистеїнлігази та цистеїндиоксигенази у гепатоцитах щурів за умов споживання надмірного вмісту сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну.

Матеріали та методи. Для дослідження використовували білих безпородних щурів віком 2,5-3 місяці та масою 130-150 г. Усі процедури з тваринами здійснювали згідно з міжнародними рекомендаціями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986), «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», схваленими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), та положеннями інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі.

Групування дослідних тварин проводили шляхом випадкової вибірки, враховуючи їх вік та масу. Оскільки поведінкові та метаболічні реакції у лабораторних щурів дуже чутливі, впродовж експерименту тварини контрольної та дослідної груп споживали напівсинтетичний раціон відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології за принципом парного харчування (Ellacott et al., 2010) з урахуванням кількості харчового протеїну та сахарози в перерахунку на кілограм дієти.

З метою моделювання аліментарної депривації протеїну щурі протягом 4 тижнів щоденно отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон, що містив 1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну (Reeves et al., 1993). Постановку дієти з високим вмістом сахарози проводили відповідно до рекомендацій (Fernandes-Lima et al., 2016).

Дослідні тварини були поділені на групи: 1 – щурі, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К); 2 – щурі, які протягом 4 тижнів отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (НПР); 3 – щурі, які протягом експерименту споживали високосахарозний раціон (ВС); 4 – щурі, які на тлі аліментарної депривації протеїну споживали надлишок сахарози (НПР/ВС).

Цервікальну дислокацію тварин здійснювали на 29 день експерименту, використовуючи ефір для створення медикаментозного сну.

Виділення гепатоцитів щурів проводили методом рециркуляційної неензиматичної перфузії з подальшим низькошвидкісним центрифугуванням тканин печінки (Петренко и др., 1991).

Життєздатність ізольованих клітин визначали шляхом фарбування барвником трипановим синім. Підрахунок кількості гепатоцитів проводили у камері Горяєва під світловим мікроскопом. Життєздатність гепатоцитів становила 93% ± 2%. Для проведення біохімічного аналізу гепатоцити вносили в кількості 3×10^6 клітин.

Концентрацію гомоцистеїну в зразках плазми крові визначали імунохімічним методом із електрохемілюмінесцентною детекцією (ECLIA) за методикою виробника.

Рівень цистеїну оцінювали за здатністю даної амінокислоти утворювати сполуку рожевого кольору при взаємодії з кислотним нінгідриновим реагентом (Gaitonde, 1967).

Активність γ-глутамілцистеїнлігази визначали за вмістом неорганічного фосфору (*Pi*) внаслідок

гідролізу АТР в реакційній суміші, що містила 0,01 М *L*-глутамат, 0,01 М *L*-амінобутират, 0,02 М $MgCl_2$, 0,005 М Na-АТР, 0,2 М трис-HCl, pH 8,2, відповідно до методики, описаної раніше (Копильчук та ін., 2014). Кількість неорганічного фосфору в надосадовій рідині визначали колориметрично методом Фіске-Суббароу.

Активність цистеїндиоксигенази досліджували за зменшенням вмісту цистеїну в реакційній суміші, яка містила 0,5 мМ цистеїн, 40 мкМ дитіотреїтол, 0,47 мМ трис-HCl, pH 7,4 (Gaitonde, 1967).

Статистичний аналіз результатів здійснювали, використовуючи стандартну статистичну програму *Microsoft Excel.* Для обробки результатів експерименту користувались t-критерієм Стьюдента. Істинними вважали відмінності між групами при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати наших попередніх досліджень показали, що за умов аліментарної нестачі протеїну спостерігається розвиток помірної гіпергомоцистеїнемії (Копильчук та ін., 2015). Водночас споживання тваринами високосахарозного раціону супроводжується підвищенням концентрації гомоцистеїну в плазмі крові на 57 % порівняно зі значеннями контрольної групи (рис. 1).

Відомо, що гомоцистеїн у крові міститься у трьох формах: близько 1-2 % циркулює у відновленій тіольній формі; 20-30 % ГЦ утворює змішаний дисульфід із цистеїном (гомоцистин) або гомоцистеїн дисульфід, перебуваючи в окисленому стані; 80 % гомоцистеїну зв'язується з протеїнами плазми крові, в основному з альбуміном, утворюючи дисульфідні зв'язки з цистеїном-34 (Jakubowski et al., 2011; Жлоба и др., 2013).

Поняття «загальний гомоцистеїн плазми крові» відображає суму концентрацій відновленої (-SH) і окисленої (-S-S-) форм амінотіолів. Основну роль в токсичних ефектах гіпергомоцистеїнемії відіграють окислені форми гомоцистеїну. Тому однією з причин встановленої нами гіпергомоцистеїнемії за умов споживання надлишку сахарози може слугувати оксидативний стрес.

За результатами останніх наукових публікацій (Li et al., 2015; DiNicolantonio et al., 2016) при надмірному споживанні сахарози після її гідролізу в кишечнику метаболізм моносахаридів – глюкози та фруктози зазнає певних змін. Наприклад, при нормоглікемії лише 3 % глюкози метаболізуються поліольним шляхом. Однак, за умов розвитку гіперглікемічних станів (що встановлено паралельними дослідженнями наукової групи при споживанні щурами високосахарозного раціону) цей показник збільшується більш ніж на 30 %. Інтенсифікація перебігу поліольного окислення глюкози може призводити до розвитку оксидативного стресу внаслідок виснаження ресурсів NADPH при перетворенні глюкози в сорбітол уже першому етапі (внаслідок зниження рівня відновленого глутатіону).

Окрім того, розвиток оксидативного стресу нерідко супроводжує другу стадію поліольного шляху (перетворення сорбітолу в фруктозу), що приводить до перетворення NAD^+ в NADH за допомогою сорбітолдегідрогенази. Враховуючи те, що NADH є безпосереднім субстратом для NADH-дегідрогеназних комплексів дихального ланцюга мітохондрій, утворення активних кисневих радикалів, насамперед, супероксидних аніонів може збільшуватися (Voloshchuk et al., 2020). Як наслідок, за даних експериментальних умов підвищується проникність клітинних мембран, і гомоцистеїн посилено надходить в кров.

З іншого боку, як описано в літературі (Qureshi et al., 2019), при гіпергомоцистеїнемії ГЦ зв'язується не з альбуміновими (як за фізіологічних умов), а з глобуліновими фракціями плазми крові, зокрема, з α_2-мікроглобуліном. При цьому гомоцистеїн формує дуже міцні змішані дисульфіди білків, які фактично не можуть відновлюватися. Даний факт узгоджується з попередніми дослідженнями вмісту протеїнових фракцій плазми крові за умов надмірного надходження сахарози та підтверджується вірогідним зростанням рівня α_2-голобулінів.

Таким чином гіпергомоцистеїнемія – це стан, коли порушується внутрішньоклітинний метаболізм ГЦ, внаслідок чого зростає рівень його надходження в плазму або знижується кліренс, та/або значно посилюється синтез даної амінокислоти.

Оскільки основним органом катаболізму гомоцистеїну є нирки, здатні утилізувати до 20 % ГЦ плазми під час проходження через них артеріальної крові (Оболенська та ін., 2011), то ще одним чинником накопичення ГЦ в плазмі можна розглядати встановлені в лабораторії раніше функціональні зміни даного органу щурів (зменшенням виведення креатиніну з сечею та розвиток макроальбумінурії), які знаходилися на високосахарозній дієті, внаслідок чого їх фільтраційна здатність щодо ГЦ буде істотно знижуватися. Плазмовий рівень гомоцистеїну корелює з рівнем креатиніну і обернено пропорційно залежить від гломерулярної фільтрації, що пояснює підвищення концентрації гомоцистеїну у разі зниженої фільтрації нирок (Приступа та ін., 2012).

Однак, за умов споживання надлишку сахарози на тлі нестачі харчового протеїну концентрація гомоцистеїну в плазмі крові щурів знижується на 43 % порівняно зі значеннями контрольної групи тварин (рис. 1). Гомоцистеїн – метаболіт, який знаходиться на перехресті метіонінового циклу та шляху транссульфування. Гомеостаз ГЦ залежить від балансу між S-аденозилметіонін(SAM)-залежним трансметилюванням, що використовує

метильні групи для синтезу гомоцистеїну; реметилюванням ГЦ назад в метіонін за допомогою фолат- і бетаїнозалежних механізмів і катаболізмом гомоцистеїну через шлях транссульфування. Недавні дослідження (Nieman et al., 2011) показали, що гіперглікемічний стан характеризується підвищеною експресією специфічних метилтрансфераз, які використовують метильні групи, похідні SAM, для синтезу гомоцистеїну. Хоча надходження метильних груп з фолат-залежного одновуглецевого пулу в умовах надмірного споживання сахарози на тлі нестачі протеїну, вірогідно, знижується, посилений синтез ГЦ компенсується стимуляцією фолат-незалежного реметилювання та катаболізму шляхом транссульфування, що призводить до гіпогомоцистеїнемії.

Печінка є основним органом, який забезпечує утилізацію ГЦ до цистеїну. Тому навіть незначне порушення її нормального функціонування призводить до значних змін метаболізму даної амінокислоти. Попередніми дослідженнями наукової групи в розрізі даної тематики (Копильчук та ін., 2014; Копильчук та ін., 2015) показано, що за умов аліментарної депривації протеїну відбувається порушення метаболізму цистеїну. Зниженням рівня даної амінокислоти в клітинах печінки щурів супроводжується пригніченням активності γ-ГЦС з одночасною активацією цистеїндиоксигенази.

У гепатоцитах щурів, які споживали високосахарозний раціон, нами встановлено підвищення вмісту цистеїну на 32 % порівняно з показниками контрольної групи. Відомо, що незамінні сульфуровмісні амінокислоти конкурують з цистеїном за транспортний білок. Ці амінокислоти легше проникають через біологічні мембрани клітини, ніж цистеїн, внаслідок чого його вміст за даних експериментальних умов залишається підвищеним.

По аналогії з патогенезом гіпергомоцистеїнемії поза увагою не можна залишити те, що механізм несприятливої дії надлишку цистеїну може бути пов'язаним з ковалентною модифікацією (цистеїнуванням) білків з наступною зміною їх функціональної активності.

Окрім того, в літературі (Jung, 2015) висловлюється думка, що існує антагоністичне співвідношення між вмістом гомоцистеїну та цистеїну. Зазначається, що за умов надлишку цистеїну гомоцистеїн витісняється зі змішаних дисульфідів (типу білок-гомоцистеїн), в свою чергу замість нього інкорпорується цистеїн.

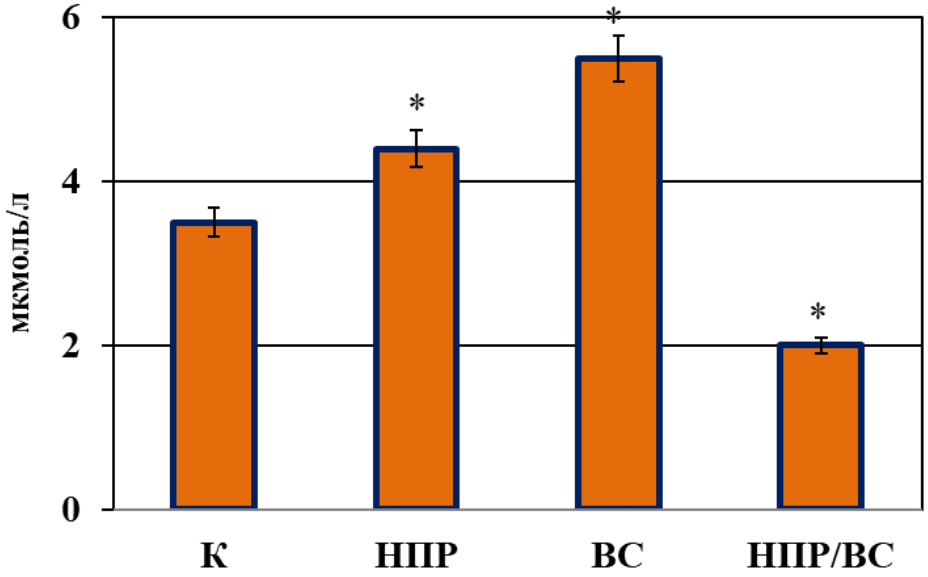

Рис. 1. Вміст гомоцистеїну в сироватці крові щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Fig. 1. The cysteine content in the serum of rats under the conditions of different nutrient provision of the diet

*Примітка (тут і надалі): К – тварини, які отримували повноцінний раціон; НПР – тварини, які споживали низькопротеїновий раціон; ВС – тварини, які перебували на високосахарозній дієті; НПР/ВС – тварини, які отримували низькопротеїновий/високосахарозний раціон; * – статистично вірогідна різниця порівняно з контролем, P ≤ 0,05.*

*Note (hereinafter): C – animals that received a balanced diet; LPD – animals that consumed a low-protein diet; HS – animals that consumed a high sucrose diet; LPD/HS – animals that received a low-protein/high sucrose diet; * – statistically significant difference compared with the control, P≤0.05.*

За умов споживання надмірного вмісту сахарози на тлі недостатності харчового протеїну відстежується протилежна тенденція змін щодо концентрації даної амінокислоти в клітинах печінки щурів. Як видно з рис. 2 нестача харчового протеїну виступає ключовим чинником зниження вмісту цистеїну (на 30 % порівняно з контролем). Оскільки відомо, що недостатній вміст екзогенного протеїну призводить до реметилювання гомоцистеїну до метіоніну, то, ймовірно, зменшення рівня цистеїну в гепатоцитах протеїнодефіцитних щурів незалежно від кількості спожитої сахарози може бути зумовлено посиленим використанням гомоцистеїну в циклі метилювання та відповідно зниженою його утилізацією під час транс сульфування (Škovierová et al., 2017).

Щодо γ-ГЦЛ, ми спостерігаємо аналогічну тенденцію змін активності ензиму (рис. 3) по відношенню до рівня даної амінокислоти (рис. 2). Вірогідно, за умов споживання надмірного вмісту сахарози в умовах оксидативного стресу активація γ-ГЦЛ спрямована на посилення синтезу відновленого глутатіону.

Водночас результати, отримані нами у групі протеїнодефіцитних щурів, які споживали надлишок сахарози, можна пояснити так: γ-глутамільний цикл є джерелом цистеїну внаслідок позаклітинного гідролізу γ-глутамілтранспептидазою. Таким чином споживання недостатньої кількості харчового протеїну призводить до зниження рівня амінокислот, виступає фактором порушення функціонування γ-глутамільного циклу та подальшого зниження γ-ГЦЛ.

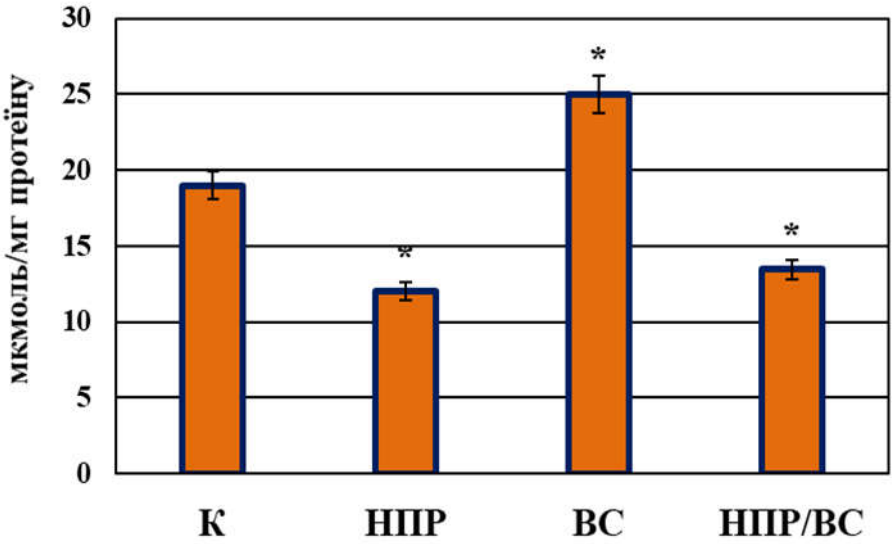

Рис. 2. Концентрація цистеїну в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Fig. 2. The cysteine concentration in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrient provision of the diet

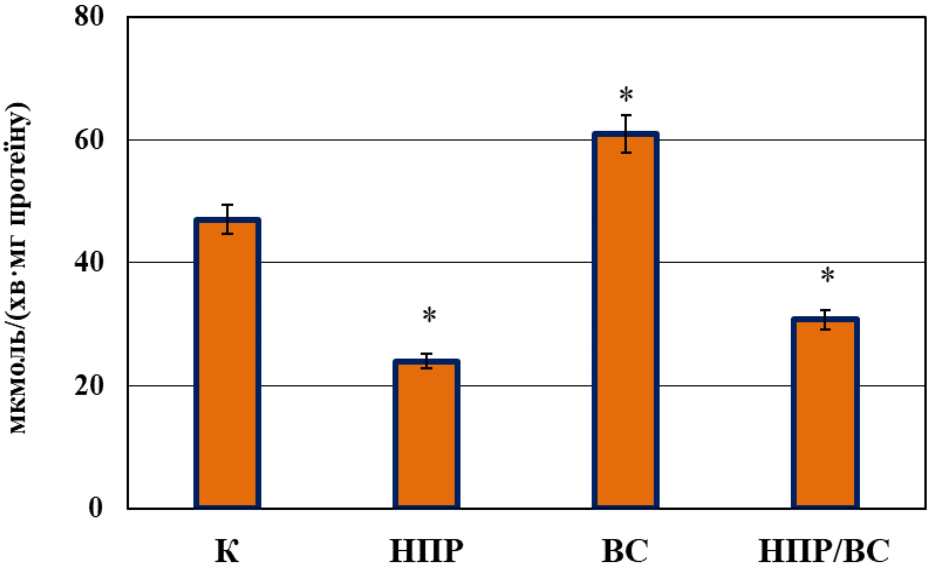

Рис. 3. γ-Глутамілцистеїнлігазна активність у гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Fig. 3. γ-glutamate-cysteine ligase activity in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrient provision of the diet

Відомо, що γ-ГЦЛ та ЦДО конкурують між собою за субстрат цистеїн. Оскільки цистеїн є лімітуючою амінокислотою синтезу GSH, то, можливо, зниження вмісту цистеїну за умов споживання надлишку сахарози на тлі нестачі протеїну може бути зумовлено прискореною утилізацією його надлишку цистеїндиоксигеназою (Prabhu et al., 2014).

Максимальне підвищення ЦДО активності (на 50 % порівняно з контролем) в гепатоцитах спостерігається за умов споживання тваринами високосахарозного-низькопротеїнового раціону (рис. 4). Окислювальний катаболізм цистеїну в цистеїносульфінат за дії цистеїндиоксигенази являє собою необоротну втрату цистеїну з пулу вільних амінокислот, оскільки в подальшому останній може перетворюватися декількома шляхами: синтез гіпотаурину/таурину, утворення пірувату та сульфіту/сульфату.

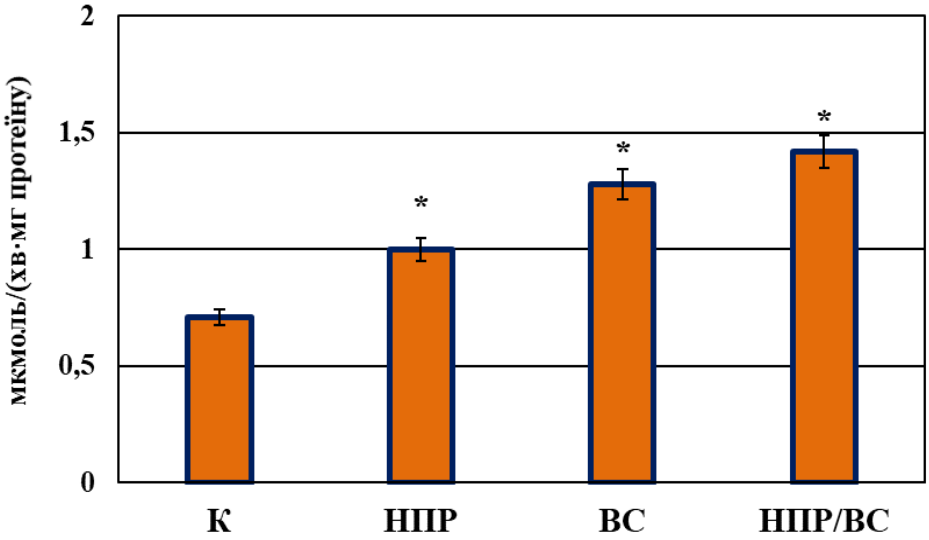

Рис. 4. Цистеїндиоксигеназна активність у гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами

Fig. 4. The cysteine dioxygenase activity in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrient provision of the diet

Отже, максимальне підвищення цистеїндиоксигеназної активності в гепатоцитах щурів за умов споживання високосахарозного/низькопротеїнового раціону на тлі зниження γ-ГЦС активності вказує на утилізацією надлишку цистеїну з утворенням таурину та сульфатів.

Висновки. Підвищений рівень гомоцистеїну в плазмі крові при споживанні надлишку сахарози можна розглядати як прогностичний маркер функціональних порушень шляху транссульфування в печінці та використовувати в діагностиці гепатопатологій. Оскільки за умов споживання високосахарозного раціону в клітинах печінки відбувається зростання вмісту цистеїну та активності γ-глутамілцистеїнсинтетази – ключового ензиму синтезу глутатіону, що, ймовірно, спрямовано на підтримання внутрішньоклітинних резервів даного трипептиду.

Отримані нами дані щодо виникнення гіпогомоцистеїнемії за умов споживання надмірної кількості легкодоступного вуглеводу на тлі нестачі харчового протеїну висвітлюють прогалини в розумінні кореляції між обмінними процесами метіоніну, гомоцистеїну та цистеїну в печінці, чутливості фолат-залежних процесів до змін у надходженні субстратів тощо. При надмірному споживанні сахарози на тлі протеїнової недостатності ключовим чинником зниження активності γ-глутамілцистеїнсинтетази та субстрату даної реакції – цистеїну – можна розглядати нестачу екзогенного протеїну, оскільки зменшується не лише кількість надходження даної амінокислоти, а й порушується її синтез із метіоніну.

Тому вирішення цих питань видається важливим для розкриття ролі взаємопов'язаних метаболічних перетворень сульфуровмісних амінокислот під час розвитку гепатопатологій нутрітивного характеру, а також можливих шляхів їх корекції.

Фінансування. Дана робота виконана в розрізі науково-дослідної держбюджетної теми «Біохімічні та лазерно-поляриметричні параметри комплексного прогнозування метаболічних порушень» (№ д/р 0119U100717).

Список літератури:

1. Жлоба А. А., Субботина Т. Ф. Оценка связывания гомоцистеина с фракцией белков плазмы, ассоциированных с ремоделированием сосудистой стенки. *Артериальная гипертензия.* 2013; 19(2): 184–188.
2. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Борщовецька Н. Л., Чопик Н. В. Активність ензимів синтезу та кон'югації глутатіону в гепатоцитах щурів за умов

низькопротеїнового раціону та гострого ураження печінки. *Біологічні системи.* 2014; 6(1): 10–15.
3. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Ніколаєв Р. О. Вміст білкових фракцій плазми крові за умов білкової недостатності. *Біологічні системи.* 2015; 7(3): 16–20.
4. Копильчук Г. П., Бучковська І. М., Островська Ю. К. Особливості транссульфування гомоцистеїну в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності. *Biological systems.* 2015; 7(2): P. 156–162.
5. Нечипорук В. М., Корда М. М. Метаболізм цистеїну при експериментальному гіпер- та гіпотиреозі в щурів. *Медична та клінічна хімія.* 2017; 19(4): 32–40. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i4.8433
6. Оболенська М. Ю., Родрігес Р. Р., Марценюк О. П. Фолатзалежні процеси у плаценті людини: експресія генів, амінотіоли, проліферація і апоптоз. *Укр. біохім. журн.* 2011; 83(1): 5–17.
7. Петренко А. Ю., Сукач А. Н., Росляков А. Д. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активность. *Биохимия.* 1991; 56(9): 1647–1650.
8. Приступа Л. Н., Грек А. В., Атаман Ю. О. Клінічне значення гомоцистеїнемії в атеросклеротичному процесі. *Вісник СумДУ. Серія «Медицина».* 2012; 1: 55–61.
9. Burchfield J. G, Kebede M. A., Meoli Ch. C., Stöckli J., Whitworth P. T., Wright A. L., Hoffman N. J., Minard A. Y., Ma X., Krycer J. R., Nelson M. E., Tan Sh.-X., Yau B., Thomas K. C., Wee N. Y., Khor E.-Ch., Enriquez R. F., Vissel B., Biden T. J., Baldock P. A., Hoehn K. L., Cantley J., Cooney G., James D. E., Fazakerley D. J. High dietary fat and sucrose results in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice. *J Biol Chem.* 2018; 293(15): 5731–5745. doi: 10.1074/jbc.RA117.000808
10. DiNicolantonio J. J., Bhutani J., O'Keefe J. H. Added sugars drive chronic kidney disease and its consequences: A comprehensive review. *J. Insulin Resistance.* 2016; 1: 1–13. doi: 10.4102/jir.v1i1.3
11. Djuric D. M. Editorial: Sulfur-Containing Amino Acids in Cardiovascular and Neural Physiology, Pathophysiology and Pharmacology: An Overview and Update. *Curr Med Chem.* 2018; 25(3): 322–323. doi: 10.2174/0929867325031801301429 00
12. Ellacott K., Morton G. J., Woods S. C., Tso P., Schwartz M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab.* 2010; 12(1): 10–17. doi: 10.1016/j.cmet.2010.06.001
13. Fernandes-Lima F., Monte T. L. Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First Hit of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs*. 2016; 201(6): 464–472. doi: 10,1159 / 000446514
14. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occuring amino acid. *Biochem. J.* 1967; 104(2): 627–633.
15. Hashimoto T., Shinohara Y., Hasegawa H. Homocysteine metabolism. *Yakugaku Zasshi.* 2007; 127(10): 1579-1592. doi: 10.1248/yakushi.127.1579
16. Jakubowski H., Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv. Clin. Chem.* 2011; 55: P. 81–103. doi: 10.1016 / b978-0-12-387042-1.00005-8
17. Jung Y. S. Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids in the Liver: A Link between Hepatic Injury and Recovery. *Biol Pharm Bull.* 2015; 38(7): 971–974. doi: 10.1248/bpb.b15-00244
18. Karmin O., Siow Y. L. Metabolic Imbalance of Homocysteine and Hydrogen Sulfide in Kidney Disease. *Curr Med Chem.* 2018; 25(3): 367–377. doi: 10.2174/0929867324666170509145240
19. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Lylyk I. S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(1): 113–119. doi: 10.15407/ubj92.01.113
20. Li L., Zhao Z., Xia J., Xin L., Chen Y., Yang S., Li K. A Long-Term High-Fat/High-Sucrose Diet Promotes Kidney Lipid Deposition and Causes Apoptosis and Glomerular Hypertrophy in Bama Minipigs. *PLoS One.* 2015; 10 (11): doi:10.1371 / journal.pone.0142884
21. Nieman K. M., Schalinske K. L. Insulin administration abrogates perturbation of methyl group and homocysteine metabolism in streptozotocin-treated type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301(3): 560-565. doi: 10.1152/ajpendo.00105.2011
22. Prabhu A., Sarcar B., Kahali S., Yuan Z. Johnson J., Adam K.-P., Kensicki E., Chinnaiyan P. Cysteine Catabolism: A Novel Metabolic Pathway Contributing to Glioblastoma Growth. *Cancer Res.* 2014; 74(3): 787-796. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1423
23. Qureshi S. S., Gupta J. K., Goyal A., Narayan Yadav H. A novel approach in the management of hyperhomocysteinemia. *Med Hypotheses.* 2019; 129:109245. doi: 10.1016/j.mehy.2019.109245
24. Rasool S., Geetha T., Broderick T. L., Babu J. R. High Fat With High Sucrose Diet Leads to Obesity and Induces Myodegeneration. *Front Physiol.* 2018; 9: 1054–1064. doi: 10.3389 / fphys.2018.01054
25. Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939 – 1951. doi: 10.1093 / jn / 123.11.1939
26. Sellmann C., Baumann A., Brandt A., Jin C.J., Nier A., Bergheim I. Oral Supplementation of Glutamine Attenuates the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis in C57BL/6J Mice. *J. Nutr.* 2017; 147(11): 2041–2049. doi: 10.3945/jn.117.253815
27. Škovierová H., Vidomanová E., Mahmood S., Sopková J., Drgová A., Červeňová T., Halašová E., Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10): 1733. doi: 10.3390/ijms17101733
28. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P., Tazirova K. A. The Features of Energy Metabolism in Hepatocytes of Rats that Receive Diets with Different Nutrient Contents. *Biophysics.* 2020; 65(2): 268–271. doi: 10.1134 / S000635092002027X

References:

1. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Evaluation of homocysteine binding with a fraction of plasma proteins associated with vascular remodeling. *Arterial hypertension.* 2013; 19 (2): 184–188. (in Russian)
2. Kopylchuk G. P., Buchkovska I. M., Borschovetska N. L., Chopyk N. V. The activity of glutathione synthesis and conjugation enzymes in rat hepatocytes under conditions of low-protein diet and acute liver injury. *Biolohichni systemy.* 2014; 6(1): 10–15. (in Ukrainian)
3. Kopylchuk H. P., Buchkovska I. M., Nikolaev R. O. Content of protein fractions of blood plasma in animals under the conditions of protein deficiency. *Biolohichni systemy.* 2015; 7(3): 16–20. (in Ukrainian).
4. Kopylchuk G. P., Buchkovska I. M., Ostrovska Y. K. Features transsulfuration pathway of homocysteine in hepatocytes rat under the conditions of protein deficiency. *Biolohichni systemy.* 2015; 7(2): P. 156–162. (in Ukrainian)
5. Nechyporuk V. M., Korda M. M. Metabolism of cysteine in experimental hyper- and hypothyroidism in rats. *Medical and Clinical Chemistry.* 2017; 19(4): 32–40. doi:10.11603/mcch.2410-681X.2017.v0.i4.8433 (in Ukrainian)
6. Obolenskaya M. Yu., Rodriges R. R., Martsenyuk O. P. Folate-related processes in human placenta: gene expression, aminothiols, proliferation and apoptosis. *Ukr. Biochem. J.* 2011; 83(1): 5–17. (in Ukrainian)
7. Petrenko A. Yu., Sukach A. N., Roslyakov A. D. Isolation of rat iiepatocytes by a non-enzymatic method: detoxicative and respiratory activities. *Biochemistry.* 1991; 56(9): 1647–1650. (in Russian)
8. Prystupa L. N., Grek A. V., Ataman Y. O. Clinical significanse of homocysteine in atherosclerotic process (literature rewiev). *Visnyk SumDU. Seriya «Medycyna».*2012; 1: 55–61. (in Ukrainian)
9. Burchfield J. G, Kebede M. A., Meoli Ch. C., Stöckli J., Whitworth P. T., Wright A. L., Hoffman N. J., Minard A. Y., Ma X., Krycer J. R., Nelson M. E., Tan Sh.-X., Yau B., Thomas K. C., Wee N. Y., Khor E.-Ch., Enriquez R. F., Vissel B., Biden T. J., Baldock P. A., Hoehn K. L., Cantley J., Cooney G., James D. E., Fazakerley D. J. High dietary fat and sucrose results in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice. *J Biol Chem.* 2018; 293(15): 5731–5745. doi: 10.1074/jbc.RA117.000808
10. DiNicolantonio J. J., Bhutani J., O'Keefe J. H. Added sugars drive chronic kidney disease and its consequences: A comprehensive review. *J. Insulin Resistance.* 2016; 1: 1–13. doi: 10.4102 / jir.v1i1.3
11. Djuric D. M. Editorial: Sulfur-Containing Amino Acids in Cardiovascular and Neural Physiology, Pathophysiology and Pharmacology: An Overview and Update. *Curr Med Chem.* 2018; 25(3): 322–323. doi: 10.2174/0929867325031801301429 00
12. Ellacott K., Morton G. J., Woods S. C., Tso P., Schwartz M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab.* 2010; 12(1): 10–17. doi: 10.1016/j.cmet.2010.06.001
13. Fernandes-Lima F., Monte T. L. Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First Hit of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs.* 2016; 201(6): 464–472. doi: 10,1159 / 000446514
14. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occuring amino acid. *Biochem. J.* 1967; 104(2): 627–633.
15. Hashimoto T., Shinohara Y., Hasegawa H. Homocysteine metabolism. *Yakugaku Zasshi.* 2007; 127(10): 1579-1592. doi: 10.1248/yakushi.127.1579
16. Jakubowski H., Głowacki R. Chemical biology of homocysteine thiolactone and related metabolites. *Adv. Clin. Chem.* 2011; 55: P. 81–103. doi: 10.1016 / b978-0-12-387042-1.00005-8
17. Jung Y. S. Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids in the Liver: A Link between Hepatic Injury and Recovery. *Biol Pharm Bull.* 2015; 38(7): 971–974. doi: 10.1248/bpb.b15-00244
18. Karmin O., Siow Y. L. Metabolic Imbalance of Homocysteine and Hydrogen Sulfide in Kidney Disease. *Curr Med Chem.* 2018; 25(3): 367–377. doi: 10.2174/0929867324666170509145240
19. Kopylchuk H. P., Nykolaichuk I. M., Lylyk I. S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(1): 113–119. doi: https://doi.org/10.15407/ubj92.01.113
20. Li L., Zhao Z., Xia J., Xin L., Chen Y., Yang S., Li K. A Long-Term High-Fat/High-Sucrose Diet Promotes Kidney Lipid Deposition and Causes Apoptosis and Glomerular Hypertrophy in Bama Minipigs. *PLoS One.* 2015; 10 (11): doi:10.1371 / journal.pone.0142884
21. Nieman K. M., Schalinske K. L. Insulin administration abrogates perturbation of methyl group and homocysteine metabolism in streptozotocin-treated type 1 diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301(3): 560-565. doi: 10.1152/ajpendo.00105.2011
22. Prabhu A., Sarcar B., Kahali S., Yuan Z. Johnson J., Adam K.-P., Kensicki E., Chinnaiyan P. Cysteine Catabolism: A Novel Metabolic Pathway Contributing to Glioblastoma Growth. *Cancer Res.* 2014; 74(3): 787-796. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1423
23. Qureshi S. S., Gupta J. K., Goyal A., Narayan Yadav H. A novel approach in the management of hyperhomocysteinemia. *Med Hypotheses.* 2019; 129:109245. doi: 10.1016/j.mehy.2019.109245
24. Rasool S., Geetha T., Broderick T. L., Babu J. R. High Fat With High Sucrose Diet Leads to Obesity and Induces Myodegeneration. *Front Physiol.* 2018; 9: 1054–1064. doi: 10.3389 / fphys.2018.01054
25. Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939 – 1951. doi: 10.1093 / jn / 123.11.1939
26. Sellmann C., Baumann A., Brandt A., Jin C.J., Nier A., Bergheim I. Oral Supplementation of Glutamine Attenuates the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis in C57BL/6J Mice. *J. Nutr.* 2017; 147(11): 2041–2049. doi: 10.3945/jn.117.253815
27. Škovierová H., Vidomanová E., Mahmood S., Sopková J., Drgová A., Červeňová T., Halašová E., Lehotský J. The Molecular and Cellular Effect of Homocysteine

Metabolism Imbalance on Human Health. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(10): 1733. doi: 10.3390/ijms17101733
28. Voloshchuk O. N., Kopylchuk G. P., Tazirova K. A. The Features of Energy Metabolism in Hepatocytes of Rats that Receive Diets with Different Nutrient Contents. *Biophysics.* 2020; 65(2): 268–271. doi: 10.1134 / S000635092002027X

THE FEATURES OF METABOLIC TRANSFORMATIONS OF HOMOCYSTEINE AND CYSTEINE IN RATS' HEPATOCYTES UNDER THE NUTRITIONAL IMBALANCE

H. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, Yu. A. Kaliuzhna

The work is devoted to the study of the homocysteine concentration in blood plasma and the activity of the enzymes of cysteine catabolic transformations γ-glutamate-cysteine ligase and cysteine dioxygenase in rats' hepatocytes under the conditions of consumption of excessive sucrose content on the background of alimentary protein deprivation. It was found, that the consumption of a high-sucrose diet in animals is accompanied by the increase of homocysteine concentration in plasma by 57% compared to control, whereas the excess of sucrose under the conditions of protein deficiency leads to hypohomocysteinemia (the content of homocysteine decreased by 43% compared to control). The increased plasma homocysteine levels in excess-consuming sucrose can be considered as a prognostic marker of functional disorders of the transsulfuration pathway in the liver and used in the diagnosis of hepatopathologies. Since, the cysteine content in liver cells increased under the conditions of high-sucrose diet consumption, the increasing γ-GCS, a key enzyme of glutathione synthesis, is probably associated with the maintenance of intercellular glutathione stores. Our data of the occurrence hypohomocysteinemia under the conditions of the consumption of excessive amounts of sucrose on the background of dietary protein deficiency highlight gaps in the understanding of the correlation between the metabolic processes of methionine, homocysteine and cysteine in the liver. Under the excessive consumption of sucrose on the background of protein deficiency, the exogenous protein deficiency can be considered as a key factor in reducing the γ-GCS activity (36%) and the cysteine content, because not only the amount of this amino acid is reduced but also its synthesis is disrupted. At the same time, the maximum increase in cysteine dioxygenase activity in rats' hepatocytes under the conditions of high-sucrose/low-protein diet consumption on the background of decreased γ-GCS activity indicates the utilization of excess cysteine with the formation of taurine and sulfates.

Keywords: homocysteine, cysteine, gamma-glutamylcysteine ligase, cysteine dioxygenase, hepatocytes, alimentary deprivation of protein, high-sucrose diet

Отримано редколегією 10.08.2020