

## ОСОБЛИВОСТІ ТРАНСУЛЬФУВАННЯ ГОМОЦИСТЕЇНУ В ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ БІЛКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. БУЧКОВСЬКА, Ю. К. ОСТРОВСЬКА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,  
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58000  
e-mail: i.buchkovska@chnu.edu.ua

*Робота присвячена визначенню концентрації гомоцистеїну в плазмі крові та активності ензимів його транссульфування – цистатіонін-β-синтази та цистатіонін-γ-ліази в гепатоцитах щурів за умов нестачі білка. З метою визначення особливостей змін даних біохімічних показників за умов аліментарної депривації білка дослідних тварин протягом 28 днів утримували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні за принципом парного харчування. Концентрацію гомоцистеїну в плазмі крові щурів визначали імуноферментним методом. Активність цистатіонін-β-синтази та цистатіонін-γ-ліази оцінювали за кількістю утвореного гідроген сульфідом. Визначення вмісту гідроген сульфідом проводили методом, що базується на утворенні барвника метиленового синього в реакціях між сульфідом та N, N-диметилпарафенілендіаміном в кислому середовищі в присутності іонів Fe<sup>3+</sup>. Встановлено, що за умов білкової недостатності підвищення концентрації гомоцистеїну в плазмі крові тварин досягає рівня 28,2 мкмоль/л, що призводить до розвитку помірної (легкої) гіпергомоцистеїнемії. Вірогідно, що підвищення рівня гомоцистеїну в плазмі крові щурів за даних експериментальних умов пов'язано зі зниженням його протеїнозв'язаної форми з одночасним зростанням вмісту вільного гомоцистеїну. Водночас за умов аліментарної депривації протеїну відбувається порушення ключових ланок транссульфування гомоцистеїну. У дослідженнях показано, що в клітинах печінки щурів відбувається зниження цистатіонін-β-синтазної активності в 2,6 рази з одночасною активацією цистатіонін-γ-ліази в 2,4 рази відповідно порівняно з показниками контролю. Оскільки, цистатіонін-γ-ліаза бере безпосередню участь в утворенні гідроген сульфідом в клітинах печінки, тому цілком очевидним є те, що підвищення цистатіонін-γ-ліазної активності супроводжується зростанням вмісту гідроген сульфідом. Встановлено, що в гепатоцитах тварин за умов білкової недостатності вміст гідроген сульфідом в 3 рази перевищує значення контролю. Таким чином гіперпродукція H<sub>2</sub>S в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності свідчить про активацію десульфуразного шляху перетворення гомоцистеїну.*

*Ключові слова: гомоцистеїн, транссульфування, гідроген сульфід, цистатіонін-β-синтаза, цистатіонін-γ-ліаза, білкова недостатність.*

**Вступ.** Інтерес до обміну сірковмісних амінокислот, зокрема метіоніну, цистеїну та гомоцистеїну, визначається участю SH-груп у регуляції внутрішньоклітинного обміну, підтриманні редокс-потенціалу клітини, регуляції проникності мембран, формуванні нативної структури білка, синтезі креатиніну, глутатіону та інших біологічно активних сполук (Miller, 2013; Нечипорук, Корда, 2010; Brosnan et al., 2008).

В центрі уваги багатьох дослідників перебуває гомоцистеїн (ГЦ) – який є проміжним продуктом метаболізму метіоніну та цистеїну. Гомоцистеїн бере участь в двох основних метаболічних реакціях перетворення метіоніну: по перше, шляхом деметилювання перетворюється в метіонін, по друге, – внаслідок транссульфування гомоцистеїн перетворюється в цистатіонін, а потім через низку ензиматичних реакцій – в цистеїн (Tehlivets et al., 2013; Kerins et al., 2011; Пентюк, 2010; Заїчко, Пентюк, 2009).

Основний метаболізм гомоцистеїну в організмі відбувається в печінці, менша частина метаболізується через нирки (Tehlivets et al., 2013; Belužić et al., 2010). В джерелах літератури (Нечипорук, Корда, 2010; Sen et al., 2010; Пентюк та ін., 2003) зазначається, що утилізація надлишку гомоцистеїну відбувається трьома шляхами: транссульфування, реметилювання та десульфурування. Відомо, що десульфуразний шлях перетворення гомоцистеїну характеризується утворенням гідроген сульфідом (H<sub>2</sub>S), фізіологічні концентрації якого володіють цитопротекторними властивостями, тоді як надмірне продукування даного метаболіту виявляє цитотоксичну дію на клітини, що супроводжується активацією вільнорадикальних процесів, зниженням пулу відновленого глутатіону, а також індукцією шляхів мітоптозу.

У роботах (Tehlivets et al., 2013, Гараєва, 2011; Баранова, Большакова, 2010) зазначається, що з підвищенням вмісту ГЦ виникає дисбаланс між

шляхами його продукування та утилізації. При цьому рівень гомоцистеїну в крові розглядається як патогенний фактор, що може призводити до розвитку гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ). Проте залишається нез'ясованим чи гіпергомоцистеїнемія – самостійний фактор ризику чи лише наслідок розвитку інших патологічних станів, які призводять до виникнення захворювань.

Попередніми дослідженнями (Копильчук та ін., 2014; Копильчук и др., 2014; Koryulchuk et al., 2014) показано зміни активності ключових ензимів катаболізму цистеїну – цистеїн-диоксигенази та  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетази. Ми припустили, що підвищення цистеїн-диоксигеназної активності за умов білкової недостатності пов'язано з прискореною утилізацією надлишку цистеїну та накопичення гомоцистеїну з розвитком ГГЦ.

Мета дослідження – визначити концентрацію гомоцистеїну та активність ключових ензимів транссульфування – цистатіонін- $\beta$ -синтази та цистатіонін- $\gamma$ -ліази в плазмі крові та гепатоцитах щурів за умов аліментарної нестачі протеїну.

**Матеріали та методи.** Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 120-150 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) (Сторожков, 2001). Протягом експерименту тварини знаходились у пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до води. Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування (Mashiko et al., 2007).

Дослідні тварини були поділені на групи:

1 – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К);

2 – тварини, які протягом 28 днів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну) (НПР) (Reeves et al., 1993).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 28 добу експерименту.

Для дослідження використовували кров, взятую із *vena portae hepatis* загальноприйнятим методом. Щоб отримати плазму крові без домішків гемоглобіну кров відразу вносили в пробірки «Vacuette», покриті сухим активатором

утворення згустку для прискорення згортання крові. Плазму крові отримували шляхом центрифугування при 1500 g.

Виділення гепатоцитів проводили неферментативним методом (Петренко и др., 1991). Тканини печінки спочатку перфузували розчином Хенкса (37°C) без EDTA шляхом введення через *v. portae* для видалення крові із судин, а потім з додаванням 2 мМ EDTA для ослаблення міжклітинних контактів внаслідок видалення іонів  $Ca^{2+}$ . Гепатоцити ресуспендували до концентрації  $2-3 \times 10^7$  кл/мл та підраховували в камері Горяєва шляхом зафарбовування в 0,2 % розчині трипановому синьому. Життєздатність клітин становила  $94 \pm 2$  %. У подальших дослідженнях гепатоцити вносили в пробу в кількості  $3 \times 10^6$  клітин.

Концентрацію гомоцистеїну в плазмі крові щурів визначали імуоферментним методом (Tehlivets et al., 2013; Kerins et al., 2011).

Активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази (ЦГЛ) оцінювали за кількістю утвореного гідроген сульфід (Заїчко та ін., 2009). Для визначення активності ЦГЛ було використано середовище, що містило в кінцевих концентраціях 0,67 мМ піридоксальфосфат, 3,3 мМ *L*-цистеїн, 0,083 М трис-НСІ буфер, рН 8,5. Отримані проби інкубували у пробірках, які герметично закривали плівкою (для уникнення втрат  $H_2S$ ). Реакцію зупиняли охолодженням пробірок на льоду та додавали 1% розчин ацетату цинку, 20 мМ розчину *N, N*-диметилпарафенілдіаміну в 7,2 М НСІ, та 30 мМ  $FeCl_3$  в 1,2 М НСІ. Екстинкцію дослідних зразків визначали при довжині хвилі 670 нм.

Активність цистатіонін- $\beta$ -синтази (ЦБС) оцінювали за утворенням  $H_2S$  з використанням такого складу інкубаційного середовища та умов дослідження, які дозволяють реально оцінити максимальне утворення  $H_2S$  у даній реакції (Заїчко та ін., 2009). Для визначення сумарної активності ЦГЛ та ЦБС використовували середовище, що в кінцевих концентраціях містило 0,67 мМ піридоксаль-фосфат, 3,3 мМ *L*-цистеїн, 0,083 М трис-НСІ буфер, рН 8,5 та 3,3 мМ ГЦ. Індивідуальну активність ЦБС розраховували як різницю між відповідними сумарною активністю (ЦГЛ + ЦБС) та активністю ЦГЛ.

Визначення вмісту гідроген сульфід проводили методом (Заїчко та ін., 2009), що ґрунтується на утворенні барвника метиленового синього в реакціях між сульфідом та *N, N*-диметилпарафенілдіаміном в кислому середовищі в присутності іонів  $Fe^{3+}$ .

Концентрацію протеїну визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Порівняння між двома групами здійснювали за допомогою програми *Microsoft Excel*, використовуючи двовибірковий *t*-критерій Стьюдента для незалежних вибірок. Вірогідними вважали відмінності між групами при  $P \leq 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Результати досліджень показали, що вміст гомоцистеїну в плазмі крові щурів, які перебували на низькопротеїновій дієті, збільшується в 1,9 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин та досягає рівня 28,2 мкмоль/л, що свідчить про розвиток легкої (помірної) гіпергомоцистеїнемії (рис. 1).

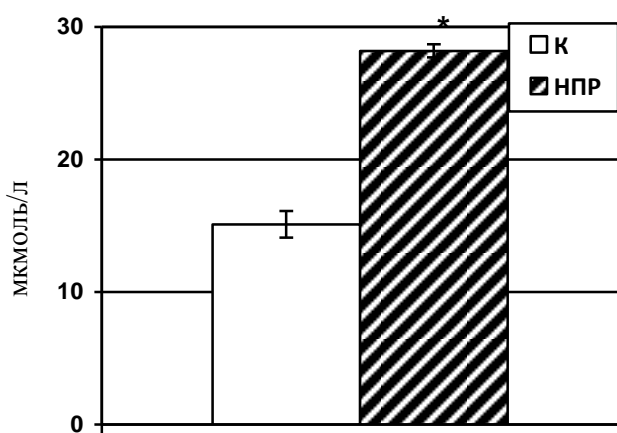
Добре відомо, що ГЦ у плазмі крові міститься, переважно, в трьох формах, а саме вільний гомоцистеїн, дисульфід ГЦ з цистеїном (гомоцистин) та зв'язаний з білком, зокрема з альбуміном. Близько 1 % гомоцистеїну циркулює в тіольній формі, 70-80 % – протеїнозв'язаний, 20-30% ГЦ утворює гомоцистеїндисульфід або змішаний дисульфід із цистеїном (Скворцов, 2011; Miller, 2013).

Вірогідно, що підвищення концентрації гомоцистеїну в плазмі крові щурів за умов

аліментарної нестачі протеїну пов'язано зі зменшенням вмісту його протеїнозв'язаної форми внаслідок зниження рівня альбуміну, що встановлено попередніми дослідженнями (Копильчук та ін., 2015), та одночасним зростанням вмісту вільного гомоцистеїну.

Оскільки метаболізм гомоцистеїну може відбуватися в трьох напрямках: перетворюється на метіонін, внаслідок транссульфування залучається до синтезу цистеїну або в незміненому стані дифундує в позаклітинне середовище (Miller, 2013; Kerins et al., 2011), то вірогідно, що саме третій шлях є безпосередньою причиною зростання загальної концентрації гомоцистеїну в плазмі крові за даних експериментальних умов. Можна припустити, що підвищення вмісту даної амінокислоти може виникати внаслідок інгібування ензимів її утилізації в печінці – цистатіонін- $\beta$ -синтази та цистатіонін- $\gamma$ -ліази.

А тому нами було досліджено, що в гепатоцитах щурів, які зазнавали аліментарної білкової недостатності, спостерігається зниження активності ключового ензиму трасульфування – цистатіонін- $\beta$ -синтази в 2,6 рази порівняно з показниками контролю (рис. 2).



**Рис. 1.** Вміст гомоцистеїну в плазмі крові щурів за умов білкової недостатності

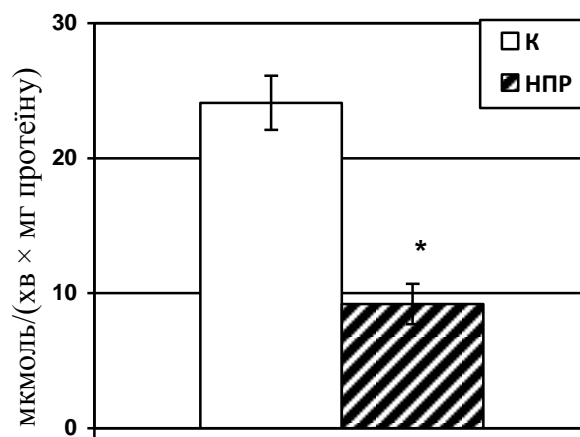
**Pic. 1.** The content of homocysteine in the blood plasma of rats under protein deficiency

Примітка (тут і надалі):

*К* – тварини, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (контроль);

*НПР* – тварини, які протягом 4 тижнів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну);

\* – статистично вірогідна різниця порівняно з показниками контролю,  $P \leq 0,05$ .



**Рис. 2.** Активність цистатіонін- $\beta$ -синтази в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності

**Pic. 2.** Activity cystathionin- $\beta$ -synthase in rat hepatocytes under protein deficiency

Note (thereafter):

*C* – animals are kept in semi-synthetic diet in all nutrients – control group;

*LPD* – animals that were over 28 days on the low-protein diet;

\* – statistically significant difference compared with control,  $P \leq 0,05$ .

Отримані результати дають можливість припустити, що вже на першому етапі утилізації гомоцистеїну за даних експериментальних умов порушуються механізми його транссульфування. Вірогідно, що надлишок даної амінокислоти в печінці буде призводити до накопичення в клітинах S-аденозилгомоцистеїну – потужного інгібітора метилтрансфераз і, як, наслідок, порушення процесів метилювання, що виступає головним патерном патогенезу гіпергомоцистеїнемії (Tehlivets et al., 2013; Kerins et al., 2011; Заїчко, 2010). Оскільки відомо, що під час накопичення в клітинах гомоцистеїну автоматично підвищується концентрація S-аденозилгомоцистеїну, а між рівнями обох сполук встановлюється чітка залежність (Tehlivets et al., 2013; Brosnan et al., 2008).

Щодо цистатіонін- $\gamma$ -ліази, яка забезпечує деградацію цистатіоніну до аміаку та  $\alpha$ -кетобутирату, то в гепатоцитах дослідної групи тварин спостерігається вірогідне підвищення активності даного ензиму в 2,4 рази порівняно зі значеннями контролю (рис. 3).

Відомо, що як цистатіонін- $\beta$ -синтаза, так і цистатіонін- $\gamma$ -ліаза беруть безпосередню участь в утворенні гідроген сульфїду в клітинах печінки, який володіє високою ліпофільністю, легко проникає через плазматичні мембрани та безпосередньо взаємодіє з внутрішньоклітинними ферментами (Sen U., 2010; Lowicka, 2007; Tripatara, 2008). Тому, цілком очевидно, що підвищення цистатіонін- $\gamma$ -ліазної активності супроводжується зростанням вмісту  $H_2S$  в гепатоцитах тварин за даних експериментальних умов.

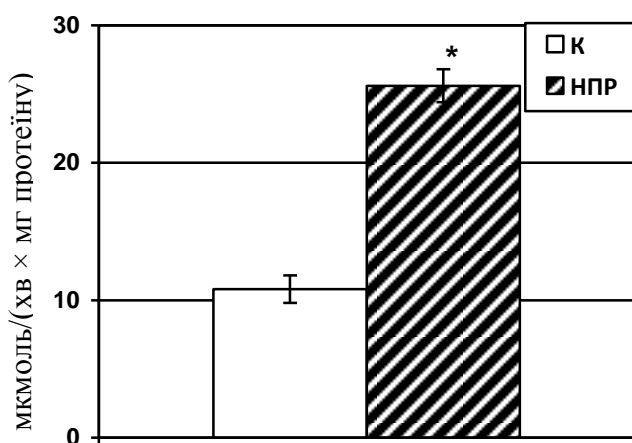


Рис. 3. Активність цистатіонін- $\gamma$ -ліази в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності

Pic. 3. The activity of cystathionin- $\gamma$ -lyase in rat hepatocytes under protein deficiency

В останні роки  $H_2S$  відносять до ендогенних модуляторів біологічних функцій організму, оскільки в межах фізіологічних концентрацій він проявляє судинорозширювальну, нейромодуляторну дію та володіє цитопротекторними властивостями (Sen et al., 2010; Wagner, 2008).

Нами встановлено, що в гепатоцитах щурів, які перебували на низькобілковій дієті даний показник збільшується в 3 рази порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 4).

Оскільки відомо, що гідроген сульфїд виступає в ролі інгібітора цитохром-*c*-оксидази, то можна припустити, що надлишок утворення цього газотрансмітера за даних експериментальних умов буде призводити до порушення окислювального фосфорилування в мітохондріях печінки щурів, перешкоджаючи при цьому процесам клітинного дихання (Волощук, Копильчук, 2015).

#### Висновки.

Отже, підвищення концентрації гомоцистеїну в плазмі крові тварин за умов білкової недостатності призводить до розвитку помірної гіпергомоцистеїнемії та порушення функціонування ключових ланок транссульфування, що виражається у зниженні цистатіонін- $\beta$ -синтазної активності з одночасною активацією цистатіонін- $\gamma$ -ліази у гепатоцитах тварин. Водночас нестача протеїну в раціоні супроводжується надмірним утворенням гідроген сульфїду в клітинах печінки тварин, що свідчить про активацію десульфуразного шляху перетворення гомоцистеїну.

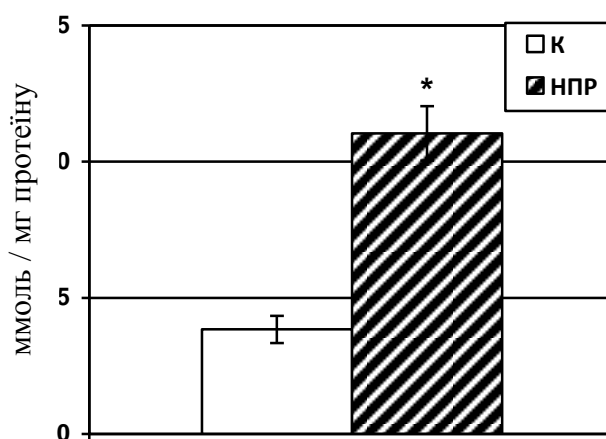


Рис. 4. Вміст  $H_2S$  в гепатоцитах щурів за умов білкової недостатності

Pic. 4. The content of hydrogen sulfide in rat hepatocytes under protein deficiency

## Список літератури:

1. Баранова Е.И., Большакова О.О. Клиническое значение гомоцистеинемии (обзор литературы) // Артериальная гипертензия. – 2010. – № 1. – С. 92-96.
2. Волощук О.Н., Копыльчук Г.П. Структурно-функциональное состояние цитохромного участка дыхательной цепи митохондрий печени в условиях алиментарной депривации протеина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 1. – С. 43-46.
3. Заїчко Н.В., Андрушко І.І, Мельник А.В. та ін. Вплив гострої метіонінової гіпергомоцистеїнемії на утворення гідроген сульфїду в органах щурів та його корекція комплексом вітамінів В<sub>6</sub>, В<sub>9</sub>, В<sub>12</sub> // Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія. – 2009. – № 4. – С. 29-35.
4. Гараева О.И. Серосодержащие аминокислоты как маркеры состояния стресса // Fiziologia si Sanocreatologia. – 2011. – № 3. – P. 315.
5. Заїчко Н.В., Пентюк О.О. Вплив аніонів гідросульфїду, дитіонїту, сульфїту, тіосульфату та сульфату на агрегацію тромбоцитів людини // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 1. – С. 105-113.
6. Заїчко Н.В. Рівні гомоцистеїну, цистеїну та гідрогенсульфїду в плазмі крові пацієнтів з тромбозами глибоких вен нижніх кінцівок: зв'язок з поліморфізмом С677Т в гені метилентетрагідрофолатредуктази // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – № 4. – С. 35-41.
7. Копыльчук 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. – Т. 6, вип. 1. – С. 10-15.
8. Копыльчук Г.П., Бучковська І.М., Ніколаєв Р.О. Вміст білкових фракцій плазми крові тварин за умов білкової недостатності // Біологічні системи. – 2015. – Т. 1, вип. 1. – С. 52-58.
9. Копыльчук Г.П., Борщовецкая Н.Л., Чопик Н.В., Бучковская И.М. Активность ключевых ферментов синтеза и конъюгации глутатиона в гепатоцитах крыс при алиментарной белковой недостаточности // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2014. – № 6-1. – С. 70-73.
10. Пентюк О.О., Луцюк М.Б., Андрушко І.І. та ін. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології // Український біохімічний журнал – 2003. – Т. 75, № 1. – С. 5-16.
11. Нечипорук В.М., Корда М.М. Сучасні аспекти обміну сірковмісних амінокислот // Медична хімія. – 2010. – № 2. – С. 126-132.
12. Пентюк О.О., Луцюк М.Б., Заїчко Н.В. та ін. Патогенетичні аспекти гіпергомоцистеїнемії та перспективи створення лікарських засобів для лікування патології, асоційованої з порушеннями обміну гомоцистеїну // Biomedical and biosocial Anthropology. – 2008. – № 10. – С. 297-303.
13. Пентюк О.О. Метаболічні предиктори фіброзу печінки у хворих на хронічні гепатити // Експериментальна і клінічна медицина – 2011. – № 1. – С. 134-138.
14. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активность // Биохимия. – 1991. – Т. 56, вып. 9. – С. 1647-1650.
15. Скворцов Ю.И., Королькова А.С. Гомоцистеин как фактор риска развития ИБС // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 3. – С.619-624.
16. Сторожков Г.И., Малышева Е.А. Оценка методик проведения исследований // Качественная клиническая практика. – 2001. – № 1.– С. 21-30.
17. Belužić R., Vugrek O. S-adenosylhomocysteine hydrolase (АНСУ ) deficiency: a natural model system for methylation research // Medical Sciences. – 2010. – № 35. – P. 77-92.
18. Hadithi M., Mulder C., Stam F. et al. Effect of B vitamin supplementation on plasma homocysteine levels in celiac disease // World J Gastroenterol. – 2009. – Vol. 15, № 8. – P. 955-960.
19. Sen U., Mishra P., Tyagi N. et al. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension // Cell. Biochem. Biophys. – 2010. – Vol. 57, № 2-3. – P. 49-58.
20. Kopylchuk G.P., Borschovetska N.L., Buchkovska I.M. The features of cysteine catabolism in rat hepatocytes under condition of protein deprivation and acute toxic hepatitis // Ukr. Biochem. J. – 2014. – Vol. 86, № 4. – P. 203.
21. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacol. Rep. – 2007. – № 59. – P. 4-17.
22. Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
23. Brosnan J.T., Jacobs R.L., Stead L.M. et al. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism // Acta biochimica polonica. – 2008. – Vol. 51, № 2. – P. 405-413.
24. Miller A.L. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases // Alternative Medicine. – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 7-19.
25. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H. et al. Pair-Feeding Study Reveals That a Y5 Antagonist Causes Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice by Modulating Food Intake and Energy Expenditure // Mol. pharmacol. – 2007. – Vol. 71, № 2. – P. 602-608.
26. Kerins D.M., Koury M.J., Capdevila A. et al. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine // Am. J. Clin. Nutr. – 2011. – № 74. – P. 723-729.
27. 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. – № 5. – P. 1939-1951.
28. Tehlivets O., Malanovic N., Visram M. et al. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1832. – P. 204-215.

29. Tripatara P. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction // *Lab. Invest.* – 2008. – №10. – P. 1038-1048.
30. Wagner C. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator // *J. Nephrol.* – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 173-176.

### References:

1. Baranova Ye.I., Bolshakova O.O. Clinical value of homocysteinemia (review of literature) // *Journal of Hypertension.* – 2010. – № 1. – P. 92-96.
2. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. The Peculiarities of the Structural and Functional State of the Cytochrome Component of the Liver Mitochondrial Respiratory Chain under conditions of low-protein diet // *Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry.* – 2015. – № 1. – P. 43-46.
3. Zaichko N.V., Andrushko I.I., Melnuk A.V. [et al.] Effect of acute hyperhomocysteinemia in methionine formation of hydrogen sulfide in the bodies of rats and its correction complex of vitamins B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub>, B<sub>12</sub> // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry* – 2009. – № 4. – P. 29-35.
4. Garayeva O.I. Sulfur-containing amino acids as markers of the state of stress // *Fiziologia si Sanocreatologia.* – 2011. – № 3. – P. 315.
5. Zaichko N.V., Pentiuk O.O. Influence of hydrogen sulfide, dithionite, sulfite, thiosulfate and sulfate anions on human platelet aggregation // *Ukrainian Biochemical Journal.* – 2009. – Vol. 81, № 1. – P. 105-113.
6. Zaichko N.V. Plasma homocysteine, cysteine, and hydrogen sulfide concentrations in patients with deep vein thrombosis of lower extremities association with methylenetetra // *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry Journal* – 2010. – № 4. – P. 35-41.
7. 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 // *Journal of Biological Systems.* – 2014. – Vol. 6., № 1. – P. 10-15.
8. Kopylchuk G.P., Buchkovska I.M., Nikolaev R.O. Content of protein fractions of protein fraction of blood plasma in animals under the conditions of protein deficiency. – 2015. – Vol., № 1. – P. 52-58.
9. Kopylchuk G.P., Borschovetska N.L., Chopyk N.V., Buchkovska I.M. The activity of glutathione synthesis and conjugation enzymes in rat hepatocytes under conditions of low-protein diet // *Actual problems of Arts and Sciences* – 2014. – № 6-1. – P. 70-73.
10. Pentiuk O.O., Lutsyuk M.B., Andrushko I.I. [et al.] The metabolism of homocysteine and its role in the pathology // *Ukrainian Biochemical Journal.* – 2003. – Vol. 75, № 1. – P. 5-16.
11. Nechyporuk V.M., Korda M.M. Modern aspects of sulfur-containing amino acids metabolism // *Medical Chemistry.* – 2010. – № 2. – P. 126-132.
12. Pentiuk O.O., Lutsyuk M.B., Andrushko I.I. [et al.] Pathogenetic aspects of hyperhomocysteinemia and prospects of creating drugs to treat pathologies associated with impaired homocysteine metabolism // *Biomedical and biosocial Anthropology.* – 2008. – № 10. – P. 297-303.
13. Pentiuk O.O. Metabolic predictors of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis // *Journal of Experimental and Clinical Medicine* – 2011. – № 1. – P. 134-138.
14. Petrenko A.Y., Sukach A.N., Roslyakov A.D. Allocation rat hepatocytes enzymatic method // *Biochemistry.* – 1991. – Vol.56, № 9. – P. 1647-1650.
15. Skvortsov Yu.I., Korolkova A. S. Homocysteine as a risk factor of ischemic heart disease development (review) // *Saratov Journal of medical scientific Research*– 2011. – Vol. 7, № 3. – P.619-624.
16. Storozhkov G.Y., Malysheva E.A. Evaluation methods for conducting of research // *Good Clinical Practice*– 2001. – № 1.– P. 21-30.
17. Belužić R., Vugrek O. S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY ) deficiency: a natural model system for methylation research // *Medical Sciences.* – 2010. – № 35. – P. 77-92.
18. Hadithi M., Mulder C., Stam F. et al. Effect of B vitamin supplementation on plasma homocysteine levels in celiac disease // *World J Gastroenterol.* – 2009. – Vol. 15, № 8. – P. 955-960.
19. Sen U., Mishra P., Tyagi N. et al. Homocysteine to hydrogen sulfide or hypertension // *Cell. Biochem. Biophys.* – 2010. – Vol. 57, № 2-3. – P. 49-58.
20. Kopylchuk G.P., Borschovetska N.L., Buchkovska I.M. The features of cysteine catabolism in rat hepatocytes under condition of protein deprivation and acute toxic hepatitis // *Ukr. Biochem. J.* – 2014. – Vol. 86, № 4. – P. 203.
21. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) the third gas of interest for pharmacologists // *Pharmacol. Rep.* – 2007. – № 59. – P. 4-17.
22. Lowry O.H., Rosenbroun N.I., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193. – P. 265-275.
23. Brosnan J.T., Jacobs R.L., Stead L.M. et al. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism // *Acta biochimica polonica.* – 2008. – Vol. 51, № 2. – P. 405-413.
24. Miller A.L. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases // *Alternative Medicine.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 7-19.
25. Mashiko S., Ishihara A., Iwaasa H. et al. Pair-Feeding Study Reveals That a Y5 Antagonist Causes Weight Loss in Diet-Induced Obese Mice by Modulating Food Intake and Energy Expenditure // *Mol. pharmacol.* – 2007. – Vol. 71, № 2. – P. 602-608.
26. Kerins D.M., Koury M.J., Capdevila A. et al. Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2011. – № 74. – P. 723-729.
27. 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. – № 5. – P. 1939-1951.
28. Tehlivets O., Malanovic N., Visram M. et al. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and methylation disorders: yeast as a model system // Biochim. Biophys. Acta. – 2013. – Vol. 1832. – P. 204-215.
29. Tripatara P. Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction // Lab. Invest. – 2008. – №10. – P. 1038-1048.
30. Wagner C. Hydrogen sulfide: a new gaseous signal molecule and blood pressure regulator // J. Nephrol. – 2009. – Vol. 22, № 2. – P. 173-176.

## FEATURES TRANSSULFURATION PATHWAY OF HOMOCYSTEINE IN HEPATOCYTES RAT UNDER THE CONDITIONS OF PROTEIN DEFICIENCY

**G. P. Kopylchuk, I. M. Buchkovska, Y. K. Ostrovska**

*The work is devoted to determining the concentration of homocysteine in plasma and enzyme activity transsulfuration pathway – cystathionine-β-synthase and cystathionine-γ-lyase in hepatocytes under the conditions of protein deficiency. To determine changes in these biochemical parameters alimentary protein deprivation experimental animals were kept for 28 days in semi-synthetic of low-protein diet the fundamental of even food. The concentration of homocysteine in the blood plasma of rats determined by ELISA. Activity cystathionine-β-synthase and cystathionine-γ-lyase evaluated by the number of formation of hydrogen sulfide. Determination of hydrogen sulfide conducted by forming dye methylene blue in reactions between sulfide and N, N-dymetylparafenilendiamin in acidic medium in the presence of ions Fe<sup>3+</sup>. Established that the conditions of protein deficiency increased concentration of homocysteine in the blood plasma of animals reaches 28.2 mmol/l, which leads to a mild hyperhomocysteinemia. Probably the homocysteine levels increase in the blood plasma of rats is associated with a decrease in its protein form content and a simultaneous increase in free form homocysteine. Under conditions of protein deprivation is a violation of the key links of the transsulfuration pathway homocysteine. It is shown that in liver cells of rats a decrease activity cystathionine-β-synthase in 2.6 times with simultaneous activation cystathionine-γ-lyase 2.4 times respectively compared with those of control. Cystathionine-γ-lyase involved in the formation of hydrogen sulfide in the liver cells, so the increased activity of the enzyme is accompanied by increased content of hydrogen sulfide. In hepatocytes of animals in terms of protein deficiency hydrogen sulfide content 3 times the value of control. Thus hyperproduction H<sub>2</sub>S in rat hepatocytes protein deficiency conditions indicates activation desulfurization pathway the transformation of homocysteine.*

*Key words: homocysteine, transsulfuration pathway, hydrogen sulfide, cystathionine-β-synthase, cystathionine-γ-lyase, protein deficiency.*

*Одержано редколегією 10.09.2015*