

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ОСОБЛИВОСТІ ТРАНССУЛЬФУВАННЯ ГОМОЦИСТЕЇНУ В
ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ДИСБАЛАНСУ НУТРИЄНТІВ В
ХАРЧОВОМУ РАЦІОНІ**

Дипломна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А група

Хабайло Олександра Юріївна

Керівник:

доктор біологічних наук

професор **Копильчук Г.П.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри

протокол №_____від_____2023 р.

Зав. кафедрою_____проф. Копильчук Г.П

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена визначенню активностей ключових ензимів транссульфування — цистатіонін- β -синтази та цистатіонін- γ -ліази в цитозольній фракції печінки щурів, а також вмісту гідроген сульфід у цитозольній фракції печінки та плазмі крові щурів за умов аліментарної депривації протеїну та надлишку сахарози в харчовому раціоні.

Встановлено зниження цистатіонін- β -синтазної активності у тварин, які отримували низькопротеїновий раціон та низькопротеїновий/високосахарозний раціон порівняно з показниками групи контролю. Натомість підвищення активності ензиму цистатіонін- β -синтази спостерігається у щурів, які споживали високосахарозний раціон.

Встановлено, що у тварин усіх дослідних груп підвищилися показники активності цистатіонін- γ -ліази порівняно з показниками контролю.

Встановлено, збільшення вмісту гідроген сульфід у цитозольній фракції печінки щурів усіх дослідних груп порівняно з показниками контролю. Максимальне підвищення вмісту гідроген сульфід зареєстровано нами у групі тварин, які отримували надлишок сахарози на тлі аліментарної нестачі протеїну.

ABSTRACT

The bachelor's thesis is devoted to determining the activity of the key enzymes of transsulfonation — cystathionine- β -synthase and cystathionine- γ -lyase in the cytosolic fraction of the liver of rats, as well as the content of hydrogen sulfide in the cytosolic fraction of the liver and blood plasma of rats under conditions of dietary deprivation of protein and excess sucrose in the diet.

A decrease in cystathionine- β -synthase activity was found in animals that received a low-protein diet and a low-protein/high-sucrose diet compared to the indicators of the control group. Instead, an increase in the activity of the enzyme cystathionine- β -synthase is observed in rats that consumed a high-sucrose diet.

It was established that the activity indicators of cystathionine- γ -lyase increased in the animals of all experimental groups compared to the control indicators.

An increase in the content of hydrogen sulfide in the cytosolic fraction of the liver of rats of all experimental groups compared to control indicators was established. The maximum increase in the content of hydrogen sulfide was registered by us in the group of animals that received an excess of sucrose against the background of dietary protein deficiency.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Біосинтез гомоцистеїну та шляхи регуляції його концентрації.....	6
1.2 Біологічна роль гідроген сульфїду в організмі	11
1.3 Регуляція шляху транссульфування.....	15
РОЗДІЛ ІІ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	17
РОЗДІЛ ІІІ. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	20
ВИСНОВКИ	25
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	26
ДОДАТКИ.....	29

Вступ

На сьогодні в центрі уваги багатьох дослідників перебуває сульфуровмісна непротеїногенна амінокислота гомоцистеїн, яка є проміжним продуктом в біосинтезі метіоніну та цистеїну, а також гомологом останнього. Концентрація гомоцистеїну регулюється двома ключовими шляхами: реметилюванням до метіоніну та транссульфуванням до цистеїну [1].

Під час транссульфування з гомоцистеїну синтезується цистеїн, який, окиснюється з утворенням неорганічних сульфатів та таурину. При цьому гомоцистеїн під дією цистатіонін- β -синтази конденсується із серином – утворюється цистатіонін. Необхідно зазначити, що за фізіологічних умов вищезгадана реакція є майже необоротною. Після цього цистатіонін руйнується за допомогою цистатіонін- γ -ліази – до цистеїну, α -кетобутирату та аміаку. Цистеїн, в свою чергу, витрачається для синтезу білків, глутатіону, перетворення в таурин, ацетил-СоА тощо. Шлях транссульфування відіграє значущу роль в усуненні потенційно небезпечного надлишку гомоцистеїну [2].

У процесах транссульфування відбувається утилізація гомоцистеїну до цистеїну та, водночас, синтезується гідроген сульфід. Синтез гідроген сульфіду із сульфуровмісних амінокислот, зокрема гомоцистеїну та цистеїну, забезпечується піридоксальзалежними ензимами: цистатіонін- β -синтазою, цистатіонін- γ -ліазою, 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою [3].

Гідроген сульфід бере участь у модулюванні різних фізіологічних реакцій, включаючи протизапальну дію, зниження окисного стресу, нейромодуляцію, судинну регуляцію, захист від реперфузійного пошкодження після інфаркту міокарда та пригнічення інсуліно-резистентності. Крім того, багато дослідників продовжують досліджувати цю сигнальну молекулу для її участі в різних аспектах клітинної функції, цитозахисту та клітинної сигналізації [4,5,6].

Мета роботи – дослідити зміни активності ензимів транссульфування гомоцистеїну – цистатіонін- β -синтази та цистатіонін- γ -ліази – в печінці щурів за умов дефіциту протеїну та надлишку сахарози в харчовому раціоні.

Для досягнення мети були поставленні **завдання**:

1. Визначити активність ензиму цистатіонін- γ -ліази в цитозольній фракції печінки щурів за умов високо вмісту сахарози на тлі аліментарного дефіциту протеїну.
2. Визначити загальну активність цистатіонін- β -синтази та цистатіонін- γ -ліази в печінці щурів за умов дефіциту протеїну та надлишку сахарози в харчовому раціоні.
3. Визначити вміст гідроген сульфід у цитозольній фракції печінки щурів за умов дефіциту протеїну та надлишку сахарози в харчовому раціоні.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біосинтез гомоцистеїну та шляхи регуляції його концентрації

Гомоцистеїн — непротейногенна сульфуровмісна амінокислота, яка є проміжним продуктом метаболізму незамінної амінокислоти метіоніну та напівнезамінної амінокислоти цистеїну, а також є гомологом останнього. [7, 8].

Біосинтез гомоцистеїну відбувається шляхом деметилювання дієтичного метіоніну та проходить в три етапи. В першій реакції ензим метіонін-аденозилтрансфераза (КФ 2.5.1.6) каталізує перенесення аденозинової групи з АТФ на метіонін, що призводить до утворення S-аденозилметіоніну. На другому етапі універсальний метиловий донор S-аденозилметіонін передає свою метильну групу акцепторним молекулам, таким як ДНК, РНК, білки та ліпіди, використовуючи ензим метилтрансферазу (МТ), в результаті чого утворюється S-аденозилгомоцистеїн. На останньому етапі S-аденозилгомоцистеїн розщеплюється ензимом S-аденозилгомоцистеїн-гідролазою (КФ 3.3.1.1) для отримання гомоцистеїну [9].

Гомоцистеїн присутній у плазмі крові в чотирьох формах: близько 1% гомоцистеїну циркулює у вигляді вільного тіолу, у 70 – 80% гомоцистеїн зв'язаний з білками плазми (головним чином з альбуміном), а у 20 – 30% дві молекули гомоцистеїну з'єднуються між собою або з іншими тіолами утворюючи димери [8].

Гомоцистеїн метаболізується двома альтернативними шляхами: в першому випадку дана амінокислота може бути незворотно деградована шляхом транссульфування, в другому — реметилювана до метіоніну — шляхом реметилювання відповідно [1].

При дефіциті метіоніну гомоцистеїн входить в шлях реметилювання, який може бути фолат-залежним, де донором метильної групи виступає 5-метилтетрагідрофолатом (5-метилТГФ) або фолат-незалежним, донор – бетаїн [1,8]. У першому випадку ензим метилкобаламінвмісна метіонінсинтаза (МС,

КФ 2.1.1.13) каталізує перехід метилу від 5-метилТГФ до гомоцистеїну, утворюючи метіонін та тетрагідрофолат (ТГФ). Дана реакція, яка відбувається практично у всіх клітинах, передбачає утворення ензим-зв'язаного метилкобаламіну. На цьому етапі метаболізм гомоцистеїну біохімічно пов'язаний з внутрішньоклітинним метаболізмом фолатів. МС перетворює циркулюючу форму фолату, 5-метилТГФ, в ТГФ, який потім може підтримувати різні клітинні реакції. До таких реакцій відноситься поліглютамація, яка необхідна для утримання внутрішньоклітинного фолата. ТГФ далі перетворюється на 5,10-метилентетрагідрофолат (5,10-метилентТГФ) ензимом серингідроксиметил-трансферазою (КФ 2.1.2.1), реакцією, яка потребує серину та піридоксаль-фосфату як кофакторів. Після реакції відновлення, яка каталізована ензимом 5,10-метилентетрагідрофолатредуктазою (МТГФР) 5,10-метилентТГФ перетворюється в 5-метилТНФ, доступний для реметилювання гомоцистеїну. МТГФР використовує ФАД (флавінаденіндинуклеотид) в якості кофактора. У зв'язку з тим, що циркулюючою формою фолієвої кислоти є 5-метилТГФ, та оскільки реакція, яка каталізується МТГФР, є необоротною, фолати, які надходять в клітини, повинні пройти реакцію з ензимом МС з метою генерації ТГФ та інших відновлених фолатів, включаючи ті, які необхідні як для пуринового, так і для піримідинового метаболізму. [1].

Бетаїн-залежне реметилювання гомоцистеїну відбувається за рахунок нефолатних донорів метилу та ензиму бетаїн-гомоцистеїнметилтрансферази (КФ 2.1.1.5), яка виробляється переважно в печінці та нирках та використовує бетаїн (триметилглїцин) як донор метилу. [1]

Рівень гомоцистеїну в організмі може бути підвищений за різних умов, включаючи неповноцінний раціон. Підвищений рівень гомоцистеїну, званий гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ), пов'язаний з підвищеним ризиком нервово-судинних захворювань, деменції, мігрені або епілепсії. Механізми, що лежать в основі нейротоксичності гомоцистеїну, включають окислювальний стрес, тіюляцію білка або гомоцистеїнелювання білка, викликаючи апоптоз і

екситотоксичність. Останні дані вказують на те, що запалення під час ГПЦ супроводжується підвищенням рівня декількох цитокінів. Концентрація гомоцистеїну регулюється двома ключовими шляхами: реметилюванням до метіоніну або транссульфуванням до цистеїну. Тому, внутрішньоклітинна концентрація гомоцистеїну знаходиться під жорстким контролем [10]

Транссульфування є основним шляхом утилізації метіоніну та гомоцистеїну, за допомогою якого атом сірки інтегрується в молекулу цистеїну. [1]

Даний шлях катаболізму гомоцистеїну до цистеїну каталізується двома піридоксаль-5'-фосфат-залежними ферментами – цистатіонін- β -синтазою (ЦБС, КФ 4.2.1.22) та цистатіонін- γ -ліазою (ЦГЛ, КФ 4.4.1.1) [11]

Як видно з рис. 1.1. ЦБС каталізує конденсацію гомоцистеїну та серину з утворенням цистатіоніну. Далі цистатіонін гідролізується ЦГЛ з утворенням цистеїну, який містить атом сірки з гомоцистеїну, α -кетобутирату (з вуглецевого ланцюга гомоцистеїну) та аміак (NH_4^+) з аміногрупи гомоцистеїну (рис. 2.2).

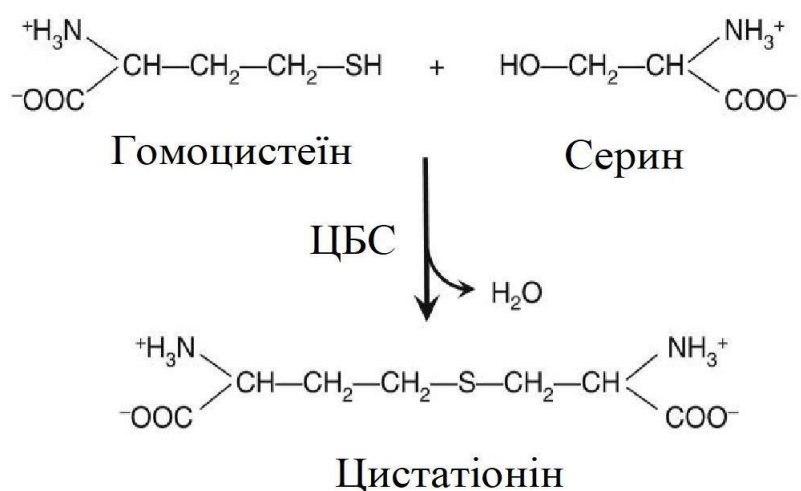


Рис. 2.1. Синтез цистатіоніну за дії цистатіонін- β -синтази

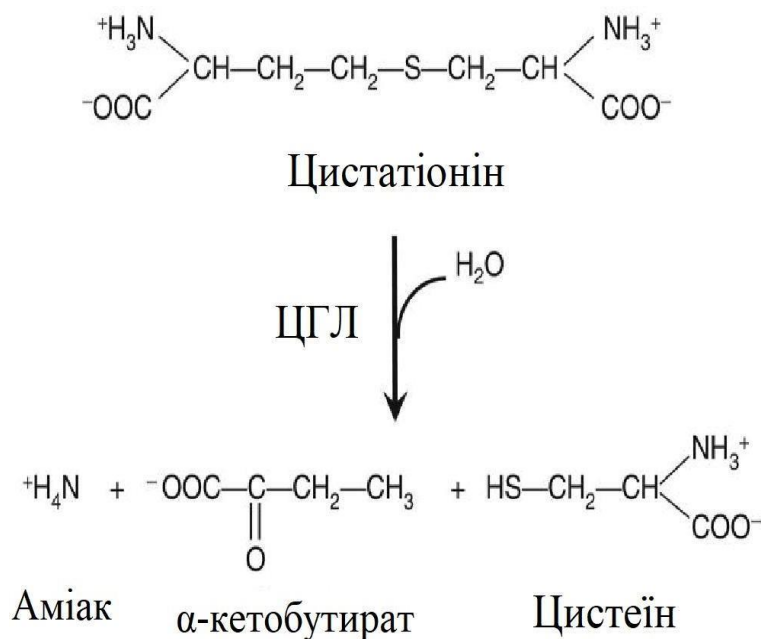


Рис. 2.2. Розщеплення цистатіоніну до α -кетобутирату, аміаку та цистеїну дії цистатіонін- γ -ліази

α -кетобутират надалі може катаболізуватись підчас реакції окисного декарбоксилювання до пропіоніл-коензиму А (КоА), який входить до циклу трикарбонових кислот на рівні сукциніл-КоА. Таким чином, шлях транссульфурації відповідає за катаболізм вуглецевого ланцюга метіоніну, вивільнення аміаку в формі, яка може бути спрямована в шляхи екскреції азоту, і перенесення сірки з метіоніну в серин для синтезу цистеїну. ЦБС є високорегульованим ензимом, причому S-аденозилметіонін діє як алостеричний активатор, який підвищує активність ЦБС стабілізуючи ензим, коли метіонін є у великій кількості [11]

Хоча транссульфураційний шлях перетворює вуглецеву і азотну групи гомоцистеїну на продукти, які вступають у центральні шляхи метаболізму палива та утилізації азоту, атом сірки переноситься на серин з утворенням нової амінокислоти, що містить тіол, цистеїн. Таким чином, подальший катаболізм цистеїну необхідний для перетворення сірки в її нормальні кінцеві

продукти (гідроген сульфід та таурин), які можуть виводитися з сечею. Також цистеїн використовується для синтезу білків, ацетил-СоА та лантіоніну. [2,11].

На додаток до своєї важливої ролі в синтезі білка, цистеїн також є компонентом основного клітинного антиоксиданту глутатіону та сам по собі є потужним антиоксидантом. Глутатіон є трипептидом, який деактивує активні форми кисню, тим самим захищаючи клітину від окисного стресу. Біосинтез глутатіону відбувається в ході двох послідовних реакцій з ензимами γ -глутамілцистеїнлігазою (КФ 6.3.2.2) та глутатіонсинтазою (КФ 6.3.2.3) [12,13]. Тому шлях транссульфування також відіграє важливу роль у підтримці окисно-відновного балансу в клітинах [14].

Хоча транссульфування призводить до біосинтезу цистеїну, ця реакція є менш критичною, оскільки цистеїн, як і інші амінокислоти, можна отримати у попередньому вигляді в раціоні. Висновок про те, що основною роллю шляху транссульфування у тварин є утилізація метіоніну/гомоцистеїну, а не біосинтез цистеїну, виглядає сумісною з його надійною регуляцією S-аденозилметіоніном, щоб мінімізувати деградацію метіоніну/гомоцистеїну, коли доступність метіоніну низька, і полегшити її, коли рівні метіоніну високі. [11].

Цистеїн також є субстратом для генерації газоподібної сигнальної молекули — гідроген сульфід (H_2S). Цистатіонін- γ -ліаза, цистатіонін- β -синтаза та 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза (3-МСТ, КФ 2.8.1.2) — три ферменти, які відповідають за біосинтез H_2S у клітинах. ЦБС генерує гідроген сульфід з комбінації цистеїну та гомоцистеїну, тоді як ЦГЛ може використовувати або цистеїн, або гомоцистеїн сам по собі для синтезу газоподібної сигнальної молекули. 3-МСТ використовує 3-меркаптопіруват шляхом утворення персульфіду в його активному центрі ($R-SH$ до $R-SSH$). Персульфід вивільняє H_2S у присутності відновника ($R'-SH$). Синтез даного газотрансміттера є ще однією з надзвичайно важливих функцій шляху транссульфування.[14].

1.2. Біологічна роль гідроген сульфід у організмі

Гідроген сульфід раніше відомий як екологічний забруднювач та токсичний газ із запахом тухлих яєць. Проте на даний час відомо, що дана сполука ендогенно синтезується різними тканинами та клітинами ссавців, а також сульфатредуючими бактеріями нижнього відділу шлунково-кишкового тракту, звідки може вільно дифундувати через клітинні мембрани [4,5].

Гідроген сульфід вважається третьою газоподібною сигнальною молекулою, газотрансміттером, в поєднанні з оксидом азоту (NO) та монооксидом вуглецю (CO) та розглядається як ключовий регулятор широкого спектру фізіологічних та патологічних процесів в серцево-судинній, імунній, ендокринній та нервовій системах, а також в шлунково-кишковому тракті[5].

H₂S бере участь у модулюванні різних фізіологічних реакцій, включаючи протизапальну дію, зниження окисного стресу, нейромодуляцію, судинну регуляцію, захист від реперфузійного пошкодження після інфаркту міокарда та пригнічення інсулінорезистентності. Крім того, багато дослідників продовжують досліджувати цю сигнальну молекулу для її участі в різних аспектах клітинної функції, цитозахисту та клітинної сигналізації [6].

Останні дослідження показують, що H₂S розслаблює кровоносні судини та знижує артеріальний тиск, шляхом відкриття АТФ-чутливих K⁺-каналів в гладких м'язах судин. H₂S діє як ефективний судинорозширювальний засіб, та як наслідок, здатний знижувати артеріальний тиск [6].

Хоча H₂S сам по собі є досить слабким антиоксидантом, дана газоподібна молекула може виявляє антиоксидантну дію через індукцію реакцій метаболізму глутатіону. H₂S підсилює активність цистеїну та транспортерів цистину для підвищення рівня субстратів для виробництва глутатіону. H₂S також послаблює окисне ушкодження астроцитів H₂O₂ шляхом збільшення поглинання глутамату. H₂S підвищує здатність антиоксидантного ензиму супероксиддисмутази (КФ 1.15.1.1) поглинати супероксид і підвищувати рівень ензиму γ-глутамілцистеїнсинтази.

Синтезований 3-меркаптопіруват-сульфуртрансферазою гідроген сульфід також може безпосередньо пригнічувати окислювальний стрес у мітохондріях. Добре відомо, що H_2S модулює функцію мітохондрій, оскільки при підвищених концентраціях він є потужним інгібітором цитохром *c* оксидази. H_2S зв'язує центр цитохром *c* оксидази, для пригнічення його активності. Завдяки цій здатності пригнічувати клітинне дихання, що, у свою чергу, знижує вироблення активних форм кисню мітохондрій та зменшує роз'єднання мітохондрій, H_2S може забезпечувати цитозахист. [6,15].

Проте при низьких мікромолярних концентраціях H_2S виступає в якості неорганічного донора для виробництва енергії мітохондріями. Віддача електронів відбувається на рівні коферменту Q під дією сульфідхіноноксидоредуктази (КФ 1.8.5.4) на H_2S [15].

Повідомлялося, що при концентраціях H_2S в діапазоні від 50 до 160 мкм в мозку функціонує як нейромодулятор, посилюючи активність рецепторів N-метил-*d*-аспартату (NMDA-рецептори). Це пояснюється тим, що H_2S може стимулювати синтез цАМФ, який потім активує протеїнкіназу A (КФ 2.7.11.11). Субодиниці NMDA-рецептора мають специфічні сайти фосфорилування для дії протеїнкінази A. Послідовне фосфорилування NMDA-рецепторних субодиниць призводить до активації збудливих постсинаптичних імпульсів, опосередкованих рецептором NMDA [16].

Було показано, що H_2S регулює різні функції імунних клітин, такі як активація та проліферація Т-клітин, апоптоз моноцитів і поліморфноядерних клітин, адгезія та інфільтрація лейкоцитів і вивільнення запальних цитокінів імунними клітинами. Останні дані підкреслили, що H_2S також активно регулює імунозапальні процеси при серцево-судинних захворюваннях [17].

Гідроген сульфід чинить антиапоптозну дію на різні органи, але багато досліджень такого характеру було проведено при ішемічно-реперфузійному (I/P) ушкодженні серця, яке часто зустрічається та призводить до апоптозу та некрозу міокарда. Було показано, що H_2S послаблює апоптоз серцевих

міоцитів, підданих впливу I/P міокарда *in vivo*. Повідомляється, що H_2S здійснює свій антиапоптотичний ефект шляхом інактивації каспази-9, викликаної I/P [6].

На важливість даного газотрансміттера вказує також широкий спектр шляхів біосинтезу H_2S організмом.

Біосинтез гідроген сульфідів відбувається ензиматичним та неензиматичним способами. Як згадувалось вище, ензиматичне утворення даного газотрансміттера опосередковуються трьома ензимами цистатіонін- β -синтазою, цистатіонін- γ -ліазою та 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою, під час метаболізму сірковмісних амінокислот, гомоцистеїну, цистеїну та метіоніну в ході шляху транссульфування. H_2S виділяється як побічний продукт.

ЦБС в своїй більшості виділяється центральною нервовою системою, тоді як місцем активного вивільнення ензимів ЦГЛ та 3-МСТ — периферичні тканини. Проте в печінці всі три ензими є високоактивними.

Кожен ензим використовує певну комбінацію субстратів та в різній мірі вносить свій внесок у загальний пул H_2S . При фізіологічно відповідних концентраціях субстрату 70% усього H_2S утворюється в результаті ЦГЛ-опосередкованих реакцій. Проте було продемонстровано, що при еквімолярних концентраціях ЦБС та ЦГЛ виробництво гідроген сульфідів ЦБС може становити приблизно 25–70% від загального пулу H_2S . Ці, здавалося б, суперечливі дослідження можна пояснити спостереженням, що при фізіологічно відповідних концентраціях субстрату понад 95% усього печінкового H_2S утворювалося через ЦГЛ-опосередковані реакції, тоді як при високих концентраціях субстрату ЦБС становив основний внесок у джерело печінкового H_2S [3].

Цистатіонін- β -синтаза бере участь у першому та визначальному етапі шляху транссульфурації: комбінації серину з гомоцистеїном, утворюючи цистатіонін та H_2O . Замість серину в якості субстрату може також виступати цистеїн, що призводить до утворення цистатіоніну та H_2S як продуктів реакції.

Крім того, ЦБС каталізує побічні реакції синтезу H_2S з цистеїну: β -заміщення цистеїну водою з утворенням серину та β -заміщення цистеїну на іншу молекулу цистеїну з утворенням лантіоніну. З даних реакцій канонічна реакція β -заміщення цистеїну на гомоцистеїн є кінетично найбільш ефективною для виробництва H_2S [18].

Цистатіонін- γ -ліаза, так як і ЦБС, каталізує побічні реакції, які призводять до утворення H_2S , такі як β -елімінація цистеїну, яка, за оцінками, є основною реакцією, що стимулює синтез гідроген сульфід у за допомогою ЦГЛ. ЦГЛ-каталізовані реакції, які призводять до утворення H_2S включають цистеїн-залежні та гомоцистеїн-залежні реакції. За нормальних умов приблизно 70% H_2S утворюється з цистеїну, а решта 30% – з гомоцистеїну. Однак в умовах гомоцистинурії, гомоцистеїн стає основним джерелом для синтезу H_2S . Окрім вищезазначених шляхів, було запропоновано альтернативний шлях синтезу H_2S цистатіонін- γ -ліазою, який включає β -елімінацію цистину, що призводить до утворення проміжного продукту тіоцистеїну, який розкладається до H_2S у неферментативній реакції з іншими тіолами. Однак значення цистину як джерела H_2S у відновлювальному внутрішньоклітинному середовищі є невизначеним [18].

3-Меркаптопіруватсульфуртрансфераза є третім основним H_2S -генеруючим ензимом, який бере участь у метаболізмі цистеїну. 3-МСТ діє разом із ензимом цистеїнамінотрансферазою (ЦАТ), яка є ідентичною аспартатамінотрансферазою (КФ 2.6.1.1), для виробництва гідроген сульфід у. 3-МСТ виробляє H_2S із 3-меркаптопірувату, який генерується ЦАТ із цистеїну з продуктом реакції — α -кетоглутаратом.

Нещодавно було показано, що 3-МСТ також може каталізувати транссульфування тіолу до персульфід у, який згодом може приєднатися до іншої молекули тіолу з утворенням дисульфід у та вивільненням H_2S [6].

1.3. Регуляція шляху транссульфування

Оскільки H_2S та цистеїн беруть участь у багатьох фізіологічних процесах, точний контроль їх виробництва має вирішальне значення для підтримки оптимального функціонування клітин. Тож не дивно, що шлях транссульфування підлягає регуляторному контролю на декількох рівнях. Ключові ензими цистатіонін- β -синтаза та цистатіонін- γ -ліаза зазнають певних модифікацій, які можуть змінити їх ферментативну активність або субклітинні локалізації. Одним з менш вивчених аспектів шляху транссульфування є з'ясування умов, які призводять до синтезу цистеїну цистатіонін- γ -ліазою на відміну від виробництва H_2S , глутатіону чи таурину. Гем в ЦБС відіграє ключову роль у перемиканні шляху транссульфування з продукції цистеїну на H_2S [19].

Коли гем зв'язується ендогенними лігандами, виробництво цистатіоніну відбувається за рахунок підвищеного внутрішньоклітинного рівня рівня серину та його більшу спорідненість до ЦГЛ в порівнянні з цистеїном. Аналогічно, спорідненість цистатіоніну до ЦГЛ більша, ніж у цистеїну, що сприяє генерації цистеїну на відміну від H_2S . В умовах стресу, коли рівень NO або CO підвищується, призводячи до пригнічення ЦБС шляхом утворення нітрозилування чи карбонілювання заліза ЦБС — гомоцистеїн накопичується, приводячи до генерування H_2S ензимом ЦГЛ [20].

Кофактор гема в N-термінальному домені CBS може зв'язувати CO або NO, що може пригнічувати його активність. Таке інгібування має значення в регуляції мікроциркуляторного русла головного мозку. Під час нормоксії CO, генерований O_2 -залежним ензимом гемоксигеназою II (КФ 1.14.99.3, НО II), зв'язується з гемом ЦБС та утримує низький рівень ензим. НО II локалізується в ендотеліальних клітинах судинної системи головного мозку, яка знаходиться в безпосередній близькості від астроцитів, де локалізована цистатіонін- β -синтаза. Під час гіпоксії, коли обмежується рівень O_2 , активність продукції НО II та CO падає, відновлюючи активність ЦБС, яка надалі може катаболізувати синтез H_2S для опосередкування артеріальної вазодилатації. Хоча невідомо, чи посередницьке інгібування монооксидом вуглецю ЦБС походить від

нейронального або ендотеліального пулів гемоксигенази II, очевидно, що обидві газоподібні сигнальні молекули взаємодіють, модулюючи основну церебральну функцію [21].

Інший режим, за допомогою якого можна модулювати ЦБС — фосфорилування. Наприклад, фосфорилування серину цистатіонін- β -синтазою в уротелії людини відбувається для підвищення продукції H_2S [22]

Активність ЦБС також може бути модульована аллостерично та стабілізована S-адинозилметіоніном, компонентом шляху трансметилування. Нестача метіоніну призводить до значного зниження рівня ензиму ЦБС через зниження концентрації S-адинозилметіоніну та дестабілізації ЦБС.

Повідомляється також, що глутатіонілювання стимулює активність цистатіонін- β -синтази людини. Підвищення активності ЦБС призводить до виробництва відновленого глутатіону, який окислюється та виснажується під час окисного стресу. Таким чином, здається розумним, що ЦБС буде модифікована відновленим глутатіоном для стимулювання продукції цистатіоніну, попередника цистеїну, доступність якого регулює швидкість продукції глутатіону під час окисного стресу.

Подібно до ЦБС, цистатіонін- γ -ліаза також може регулюватися через модифікації. ЦГЛ має сайт фосфорилування, який модулює активність ензиму [21].

РОЗДІЛ II МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводились на білих безпородних щурах масою 120-160 г, віком 120-150 днів. Всі маніпуляції з тваринами, які здійснювались в ході експерименту, відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин (Страсбург, 1986), що використовуються для дослідних і

наукових цілей», та рекомендаціям VII Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Модель дослідження передбачала поділ тварин на наступні групи:

I група контролю – щурі, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами (К) [23],

II група – щурі, які перебували на напівсинтетичному низькопротеїновому раціоні (НПР) [24],

III група – щурі, які протягом експерименту споживали високосахарозний раціон (ВС) [25],

IV група – щурі, які споживали надлишок сахарози на тлі аліментарної депривації протеїну (НПР/ВС).

Цервікальну дислокацію тварин здійснювали на 29 день експерименту, для цього тварин піддавали впливу легкого ефірного наркозу.

2.2.1 Виділення цитозольної фракції печінки щурів

Тканини печінки щурів перфузували розчином фосфатносольового буферу протягом 15-20 хвилин. Вологу знімали фільтрувальним папером. Гомогенізацію тканин печінки проводили в 0,25 М розчині сахарози. Отриманий гомогенат фільтрували через чотири шари марлі з подальшим центрифугуванням при 12 000 g протягом 15 хвилин. До 9 V надосадової рідини додавали 1 V 80 мМ розчину CaCl_2 та 1 V 160 мМ MgCl_2 в 10 мМ трис- HCl буфері, рН 7,4. Дослідні зразки перемішували протягом 10 хвилин при температурі 4° C та центрифугували при 10 000 g впродовж 15 хвилин. Надосадову рідину, цитозольну фракцію, відбирали.

Вміст білка визначали за методом Лоурі [26].

2.2. Визначення активності цистатіонін-γ-ліази

Активність цистатіонін-γ-ліази оцінювали за кількістю утвореного гідроген сульфід. Для визначення активності ЦГЛ було використано середовище об'ємом 1 мл, що містило 0,7 мл 0,67 мМ піридоксальфосфату, 0,2 мл 3,3 мМ L-цистеїну та 0,1 мл 0,083 М трис-НСІ буфер, рН 8,5. В пробірки з середовищем додавали по 0,2 мл цитозольної фракції печінки щурів та інкубували 30 хвилин при 37° С. Проби герметично закривали плівкою для уникнення витрат H_2S . Реакцію зупиняли на льоду при додаванні 1 мл 20 % трихлороцтової кислоти (ТХО), після чого проби центрифугували впродовж 10 хв. при 3 000 g. До відібраного супернатанту (1,5 мл) додавали 0,5 мл 1 % розчину ацетату цинку, 0,5 мл 20 мМ розчину N, N-диметилпарафенілендіаміну в 7,2 М НСІ та 0,5 мл 30 мМ FeCl_3 в 1,2 М НСІ. Екстинкцію проб вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 670 нм [27].

Формула перерахунку активності цистатіонін-γ-ліази:

$$A_{\text{ЦГЛ}} = \text{нмоль } \text{H}_2\text{S} / (30 \text{ хв. мг протеїну})$$

2.2.3 Визначення активності цистатіонін-β-синтази

Для визначення сумарної активності ЦГЛ та ЦБС використовували середовище об'ємом 1 мл, що в кінцевих концентраціях містило 0,7 мл 0,67 мМ піридоксальфосфату, 0,1 мл 3,3 мМ L-цистеїну, 0,1 мл 3,3 мМ гомоцистеїну та 0,1 мл 0,083 М трис-НСІ буфер, рН 8,5 [27].

Індивідуальну активність ЦБС розраховували за наступною формулою:

$$A_{\text{цбс}} = (A_{\text{цгл}} + A_{\text{цбс}}) - A_{\text{цгл}}.$$

2.2.4 Визначення вмісту гідроген сульфїду

Принцип методу ґрунтується на утворенні барвника метиленового синього в реакціях між сульфїдом та N, N-диметилпарафенїлендіамїном в кислому середовищі в присутності іонів Fe³⁺.

У дослідні проби вносили по 0,5 мл 1 % розчину ацетату цинку, 2 мл дистильованої H₂O та 0,1 мл цитозольної фракції. Після ретельного перемішування в проби додавали 0,5 мл 20 мМ розчину N, N-диметилпарафенїлендіамїну в 7,2 М HCl та 0,5 мл 30 мМ FeCl₃ в 1,2 М HCl. Проби перемішували та інкубували 20 хв. при температурі 25° С. Реакцію зупиняли додаванням 1 мл 20 % ТХО та центрифугували впродовж 10 хв. при 3 000 g. В якості контролю використовували дистильовану воду. Екстинкцію проб вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 670 нм [27].

Вміст гідроген сульфїду в плазмі щурів визначали тим ж методом, замість цитозольної фракції в дослідні проби додавали плазму.

2.2.5 Статистичний аналіз даних

Статистичний аналіз отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційної статистики. Порівняння між дослідними групами та групою контролю здійснювали за допомогою програми Microsoft Excel, використовуючи двовибірковий t-критерій Стюдента для незалежних вибірок. За вірогідні приймали відмінності між групами при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Визначення активності цистатіонін-β-синтази в цитозольній фракції печінки щурів

Результати проведених досліджень показали, що в цитозольній фракції печінки щурів, які отримували низькопротеїновий раціон, спостерігається зниження цистатіонін-β-синтазної активності на 60% порівняно зі значеннями контролю. Такі ж результати зниження активності ЦБС спостерігаються в тварин, яких утримували на низькопротеїновому харчовому раціоні з надмірним вмістом сахарози (рис. 3.1).

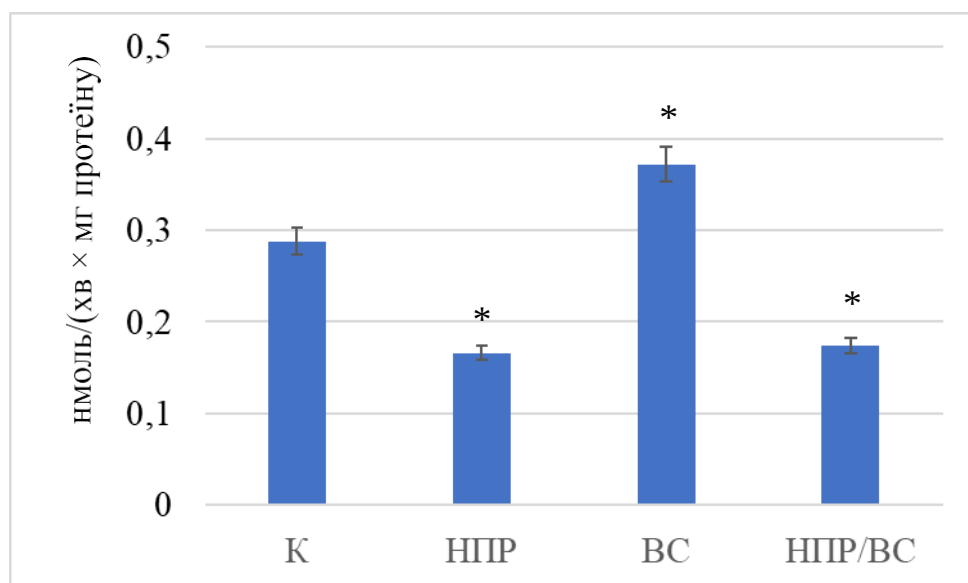


Рис. 3.1. Активність цистатіонін-β-синтази в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Адеметонін (S-аденозилметіонін, SAdMe) є універсальним біологічним кофактором, необхідним для більшості реакцій метилювання нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, гістонів, біогенних амінів і білків.

SAdMe в організмі людини синтезується з L-метіоніну за допомогою двоступеневої реакції перенесення аденозильної частини АТФ, каталізатором якої являється печінковий фермент метіонін-аденозилтрансфераза (МАТ).

Численні дослідження повідомляють, що порушення метаболізму метіоніну, що приводить до дефіциту SAdMe [28].

Одним із можливих механізмів зниження активності ключового ензиму транссульфування може виступати **низький рівень S-аденозилметіоніну** в печінці, що спрямовує метаболізм гомоцистеїну в бік утворення метіоніну, що підтверджується встановленим попередньо розвитком гіпергомоцистеїнемії за даних експериментальних умов.

Окрім того відомо, що ЦБС жорстко регулюється S-аденозилметіоніном (SAM), який є універсальним донором метильної групи, через алостеричну активацію. SAM нековалентно зв'язується з гемовою групою в ЦБС, контролюючи окисно-відновну чутливість ЦБС, та стабілізує ензим. Тому низькі концентрації SAM може призвести до зниження активності ЦБС.

Натомість протилежна тенденція змін спостерігається у групі тварин, які отримували надлишок сахарози у харчовому раціоні, де активність ЦБС збільшилась в 1,3 рази (рис. 3.1). Із літератури [29] відомо, що на тлі довготривалого споживання високовуглеводних дієт може розвиватися оксидативний стрес, що сприяє підвищенню активності ключових ензимів синтезу цистеїну, який в подальшому буде використовуватись для поповнення пулу відновленого глутатіону. Отримані нами дані узгоджуються із результатами попередніх досліджень щодо активації ензиму γ -глутамілцистеїнліази в печінці щурів за даних експериментальних умов [30].

З отриманих нами результатів можна зробити висновок, що недостатня кількість харчового протеїну в раціоні виступає ключовим фактором зниження активності ЦБС в печінці щурів. Тоді як споживання надмірного вмісту сахарози супроводжується підвищенням цистатіонін- β -синтазної активності.

3.2 Визначення активності цистатіонін- γ -ліази в цитозольній фракції печінки щурів

Зниження цистатіонін- β -синтазної активності за умов дефіциту протеїну в харчовому раціоні очевидно, супроводжується зниженням вмісту цистатіоніну – субстрату для наступного ферменту транссульфуразного шляху – цистатіонін- γ -ліази. Тому парадоксальний, на перший погляд, встановлений нами факт одночасного підвищення цистатіонін- γ -ліазної активності у всіх дослідних групах тварин в понад 1,3 рази (рис. 3.2), можна пояснити активацією альтернативної реакції конденсації двох молекул гомоцистеїну з утворенням гомоцистеїнолактону та гідроген сульфід. Оскільки активний центр ЦГЛ, на відміну від ЦБС, може вмістити дві молекули гомоцистеїну для їх конденсації [14].

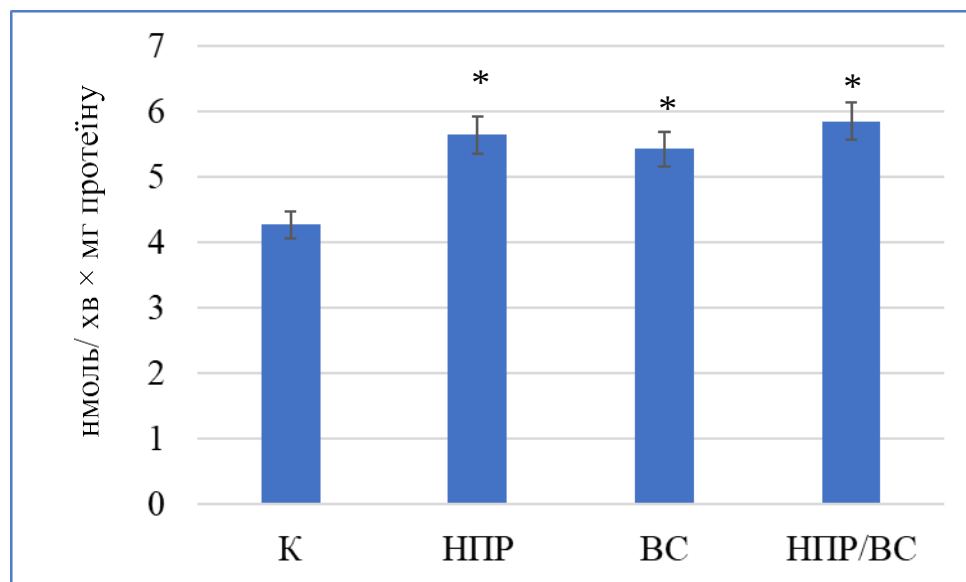


Рис. 3.2. Активність цистатіонін- γ -ліази в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Згідно з дослідженнями [31] концентрація H_2S , що утворюється в результаті гомоцистеїнзалежних реакцій, зростає пропорційно ступеню гіпергомоцистеїнемії. Це означає, що ЦГЛ може відігравати значну роль в утилізації гомоцистеїну при патофізіологічному підвищенні концентрації гомоцистеїну, особливо в тканинах або органах з дефіцитом ЦБС.

3.2 Визначення вмісту гідроген сульфід в цитозольній фракції печінки та плазмі щурів

Результати досліджень показали, що в цитозольній фракції печінки та плазмі крові щурів усіх дослідних груп спостерігається вірогідне підвищення вмісту H_2S порівняно з показниками контролю (рис. 3.4, 3.5). Щодо групи тварин, які споживали низькопротеїновий раціон, то логічним є зростання даного показника в 1,3 рази порівняно з контролем, оскільки за вищевказаними результатами досліджень за умов дефіциту протеїну активується цистатіонін- γ -ліаза, яка синтезує H_2S з двох молекул цистеїну [18].

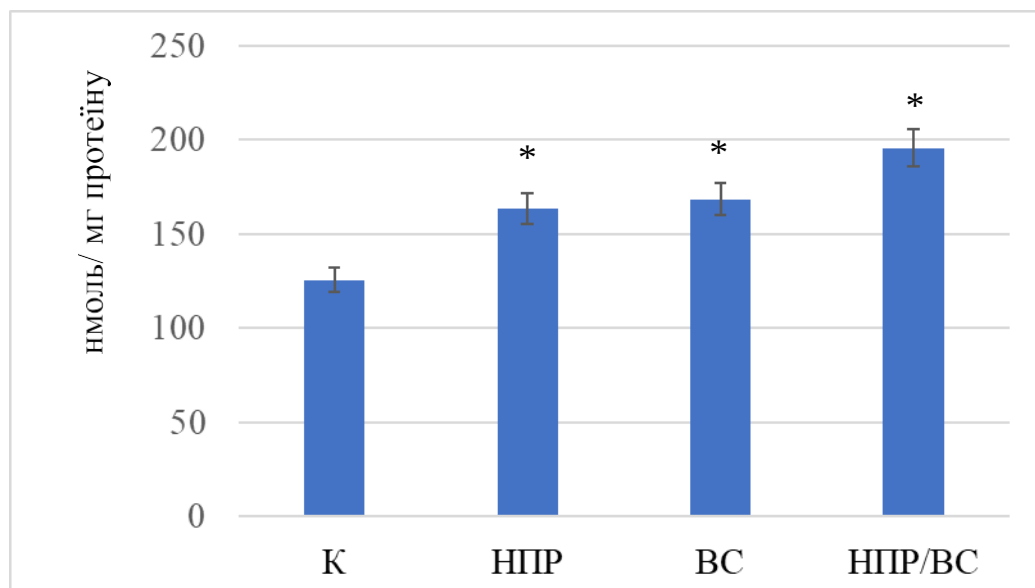


Рис. 3.4 Вміст гідроген сульфїду в цитозольній фракції печінки щурів

Аналогічна тенденція змін гідроген сульфїду спостерігається у групи щурів, які отримували високосахарозний раціон. Максимальне підвищення тлі аліментарної нестачі протеїну, перевищуючи значення контрольних величин у 1,6 рази.

Відомо, що H_2S може неензиматично синтезуватись з глюкози або через гліколіз, або з фосфоглюконату через НАДФН-оксидазу. Окрім того, глюкоза реагує з метіоніном, гомоцистеїном або цистеїном з утворенням газоподібних сполук сірки – метанетіолу та сірководню [6].

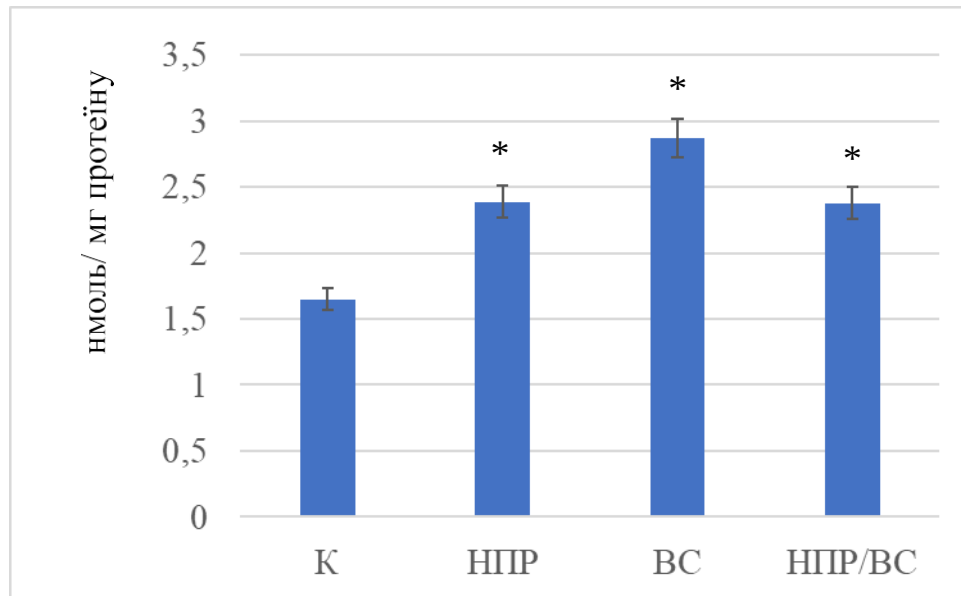


Рис. 3.5 Вміст гідроген сульфїду в плазмі щурів

Тому при споживанні надмірної кількості сахарози, глюкоза, як один із продуктів гідролізу даного дисахариду, ймовірно, може вступати в подібні реакції, що супроводжується надмірним утворенням H_2S за даних експериментальних умов. Отже, максимальне підвищення вмісту гідроген сульфїду в цитозольній фракції клітин печінки щурів зареєстровано у тварин, які споживали надлишок сахарози за умов аліментарної нестачі протеїну в цитозольній фракції печінки щурів.

ВИСНОВКИ

1) нестача протеїну в харчовому раціоні супроводжується порушенням транссульфуразного шляху, метаболізму гомоцистеїну, що характеризується зниженням ЦБС-активності з одночасною активацією ЦГЛ в цитозольній фракції печінки щурів.

2) споживання надлишку сахарози призводить до підвищення досліджуваних ензиматичних активностей з посиленням утворенням гідроген

сульфіду в печінці та крові щурів, що вказує на активацію дисульфуразного шляху обміну сульфоровмісних амінокислот.