

АКТИВНІСТЬ ЕНЗИМІВ РЕГЕНЕРАЦІЇ ГЛУТАТІОНУ В ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ НУТРИТИВНОГО ДИСБАЛАНСУ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. НИКОЛАЙЧУК*, В. З. СОРОКА

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012

*e-mail: i.nykolaichuk@chnu.edu.ua

У роботі представлені дослідження редокс-статусу глутатіонової системи та активності ензимів регенерації глутатіону в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону протеїном та сахарозою: вмісту відновленої та окисленої форм глутатіону, редокс-індексу глутатіону, глутатіонредуктазної та глюкозо-6-фосфатдегідрогеназної активностей. Впродовж експерименту дослідні тварини споживали напівсинтетичний раціон AIN-93 відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології. Виділення гепатоцитів проводили неензиматичним методом розчином Хенкса з додаванням 2 мМ EDTA. Концентрацію відновленого глутатіону досліджували за допомогою реактиву Елмана після депротейнізації зразків на спектрофотометрі CARY 60 (США) при довжині хвилі 412 нм. Для визначення вмісту окисленого глутатіону до реакційної суміші вносили цинковий пил з метою переведення окисленої форми у відновлену. Активність глутатіонредуктази в гепатоцитах визначали за швидкістю окислення NADPH+H⁺. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази досліджували за швидкістю відновлення NADP⁺ при довжині хвилі 340 нм. Встановлено, що за умов споживання надмірного вмісту сахарози на тлі нестачі харчового протеїну в гепатоцитах щурів відбувається максимальне зниження вмісту GSH (в 4,5 разів порівняно з контролем) з одночасним зростанням рівня GSSG (у 12 разів порівняно з контролем), що характеризується достовірним зменшенням редокс-індексу глутатіону та вказує на порушення окисно-відновної рівноваги у спряженій системі перетворення GSH ↔ GSSG. Дефіцит харчового протеїну призводить до активації ензимів регенерації глутатіону – глутатіонредуктази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в гепатоцитах щурів, що, ймовірно, спрямовано на підтримку стабільного рівня GSH за умов порушення процесу його синтезу в γ -глутамілцистеїнсінтеазній реакції. Надмірне споживання сахарози виступає ключовим чинником зниження активності досліджуваних ензимів у клітинах печінки щурів, що призводить до блокування першого етапу пентозо-фосфатного циклу. Тому зменшення кількості NADPH, як наслідок встановлених змін, можна розглядати як одну із причин зниження вмісту відновленого глутатіону в клітинах печінки тварин за даних експериментальних умов.

Ключові слова: глутатіон, глутатіонредуктаза, глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, редокс-індекс, гепатоцити, високосахарозний раціон, аліментарна депривація протеїну.

Вступ. На сьогодні актуальним залишається питання щодо можливих механізмів формування метаболічних змін за умов порушення збалансованості раціону макронутрієнтами. Надмірне споживання легкодоступних вуглеводів (рафінованого цукру, цукрозамінників, солодощів, здобних виробів, енергетоніків тощо) за умов значного дефіциту протеїнів досить часто характеризується виникненням нутритивного дисбалансу (Stanhope, 2016; Jensen et al., 2018). Аліментарне перевантаження сахарозою на тлі білкової недостатності може виступати одним із чинників, що сприяє ініціації та прогресуванню метаболічних розладів, зокрема, в печінці.

Інтенсивність окисно-відновних процесів відображає тіол-дисульфідний обмін, що досягає 0,5 % SH-сполук від загального пулу клітинних тіолів. Безпосереднім учасником клітинного редокс-статусу є система GSH, яка підтримує фізіологічну Біологічні системи. Т. 13. Вип. 2. 2021

прооксидантно-антиоксидантну рівновагу, утворює GSH, GSSG, S-нітрозоглутатіон (GSNO) і змішані дисульфіди GSH з протеїнами (Meyer et al., 2005). Традиційні уявлення про біохімічні функції GSH як ключового антиоксиданта при оксидативному та нітрозативному стресі, кофактора в глутатіонозалежних реакціях детоксикації, регуляції активності ензимів, пов'язаних з GSH або GSSG, які здійснюють глутатіонування сульфгідрильних груп з утворенням протеїнозв'язаних дисульфідів GSH (Oestreich et al., 2019), стали ширше. Розглядається участь GSH в утворенні цитокінів, імунній відповіді, мітохондріальному метаболізмі, депонуванні цистеїну, підтриманні гомеостазу мікроелементів, здійсненні редокс-сигналіngu і регуляції клітинної проліферації, диференціації та апоптозу (Nagy, 2013; Bachhawat et al., 2018).

Підтримання вмісту GSH здійснюється не тільки за рахунок синтезу *de novo*, а й активності глу-

татіонредуктази (КФ 1.8.1.7, ГР), яка відновлює GSSG в присутності NADPH до GSH (Couto et al., 2016). Необхідний для відновлення глутатіону NADPH генерується в реакціях пентозофосфатного циклу за дії дегідрогенази глюкозо-6-фосфату (КФ 1.1.1.49, Г-6-ФДГ) (Chen et al., 2019).

Враховуючи вищесказане, метою роботи стало дослідження редокс-статусу глутатіонової системи та активності ензимів регенерації глутатіону в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону протеїном та сахарозою.

Матеріали та методи. Для досліджень використовували білих щурів масою 100-120 г та віком 2,5-3 місяці. Усі маніпуляції проводили відповідно до загальних етичних принципів експериментів на тваринах, регламентованих положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р., зі змінами, 1998 р.) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Щурів утримували у пластмасових клітках із піщаною підстилкою та вільним доступом до води. Дослідні тварини протягом експерименту споживали напівсинтетичний раціон AIN-93 відповідно до рекомендацій Американського інституту нутрієнтології (Reeves et al., 1993).

Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу *pair-feeding* (Lind T. et al., 2018).

Високосахарозну дієту моделювали відповідно до рекомендацій (Fernandes-Lima, 2015).

Дослідні тварини були поділені на групи:

- 1 – щури, які утримувалися на напівсинтетичному раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами – група контролю (К);
- 2 – щури, які протягом 4 тижнів отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загальноприйнятої норми добової потреби протеїну) (НПР);
- 3 – щури, які впродовж експерименту споживали високосахарозний раціон (ВС);
- 4 – щури, які наприкінці харчового протеїну споживали надлишок сахарози (НПР/ВС).

Тривалість експерименту складала 28 днів. Усіх тварин виводили з досліду шляхом цервікальної дислокації шийних хребців після попередньої легкої наркотизації дієтиловим ефіром.

Виділення гепатоцитів проводили неензиматичним методом (Kravchenko et al., 2002). 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+} . Отримані гепатоцити (осад) ресуспендували в розчині Хенкса без

EDTA до концентрації $2-3 \times 10^6$ кл/мл та підраховували в камері Горяєва шляхом фарбування в 0,2 % трипановому синьому. Життєздатність гепатоцитів становила 93 ± 2 %.

Концентрацію відновленого глутатіону в гепатоцитах досліджували за допомогою реактиву Елмана після депротейнізації зразків. Принцип методу ґрунтується на взаємодії 5,5'-дитіобіс-2-нітробензойної кислоти з вільними SH-групами глутатіону. В результаті даної реакції утворюється забарвлений продукт – тіонітрофенільний аніон, кількість якого прямо пропорційна вмісту SH-груп глутатіону (Салига, 2013). Екстинкцію дослідних зразків вимірювали на спектрофотометрі CARY 60 (США) при довжині хвилі 412 нм.

Для визначення вмісту окисленого глутатіону до реакційної суміші вносили цинковий пил з метою переведення окисленої форми у відновлену (Іскра, 2013). Таким чином отримували вміст загального глутатіону (GSH + GSSG). Концентрацію окисленої форми глутатіону визначали за різницею вмісту загального та відновленого глутатіону.

Активність глутатіонредуктази в гепатоцитах визначали методом (Власова и др., 1990), що ґрунтується на вимірюванні швидкості окислення NADPH+H⁺ та реєструється за зменшенням адсорбції при довжині хвилі 340 нм. Для цього безпосередньо в кювету вносили 100 мкл гепатоцитів, 50 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,0, що містив 1 мМ EDTA, 0,5 мМ розчин окисленого глутатіону. Реакцію відновлення глутатіону ініціювали шляхом додавання 0,1 мМ розчину NADPH+H⁺. Коефіцієнт молярного поглинання для перерахунку активності ензиму становив $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази досліджували методом, описаним у літературі (Stantont, 2012). Реакція утворення NADPH+H⁺ практично незворотна, тому активність ензиму визначають за швидкістю відновлення NADP⁺. До реакційної суміші, що містила 0,05 М трис-НСl буфер, рН 7,5, 0,1 мМ MgSO₄, 0,005 М NADP додавали 100 мкл гепатоцитів. Реакцію запускали додаванням 1,5 мМ розчину глюкозо-6-фосфату. Екстинкцію дослідних зразків вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 340 нм протягом 3 хв.

Статистичний аналіз отриманих результатів досліджень здійснювали з використанням прикладних програм статистичного аналізу *Microsoft Excel 2010* та *STATISTICA 6.0*. Для оцінки міжгрупових відмінностей застосовували параметричний t-критерій критерій Стьюдента. Різницю між показниками вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Результати досліджень засвідчують зниження вмісту відновленого глутатіону (рис. 1, а) на тлі підвищення рівня

його окисленої форми в гепатоцитах усіх дослідних груп щурів (рис. 1, б). Відомо, що пул відновленого глутатіону (GSH) в організмі забезпечується трьома шляхами: внутрішньоклітинний синтез, надходження екзогенного глутатіону через плазматичні мембрани, а також відновлення його з окисленої форми (GSSH) (Forman et al., 2009). Тому, як показано попередніми дослідженнями (Копильчук та ін., 2014), зменшення концентрації GSH у печінці тварин за умов споживання низькопротеїнового раціону пов'язано з порушенням його синтезу внаслідок недостатності амінокислот. Також встановлено закономірність, ймовірно, можна пояснити тим, що за умов нутритивного дисбалансу спостерігається зниження активності γ -глутамілцистеїнсинтетази, яка бере участь в каталізі першої АТФ-залежної стадії синтезу глутатіону із цистеїну та глутамату (Копильчук та ін., 2020).

Окрім того, сам глутатіон може слугувати резервом цистеїну, а кількість вільного цистеїну виступає лімітуючим фактором синтезу GSH *de novo*. Тому, ймовірно, за умов нестачі протеїну зменшення вмісту GSH можна пов'язати із його частковим розпадом задля вивільнення амінокислот, які в подальшому будуть використані для синтезу тканинних білків.

За умов споживання надмірної кількості сахарози встановлено аналогічну тенденцію змін вмісту відновленого глутатіону, тоді як поєднання двох несприятливих чинників супроводжувалось мак-

симальним зниженням концентрації GSH у 4 рази порівняно з контролем (рис. 1, а).

Зниження вмісту відновленого глутатіону в клітинах печінки тварин може ініціювати розвиток оксидативного стресу та поглиблювати процеси пероксидації ліпідів та протеїнів. За даних умов такі зміни можна пояснити, використовуючи різні підходи: по-перше, вірогідно, відбувається посилене використання GSH в глутатіонтрансферазній чи глутатіонпероксидазній реакції; по-друге, порушуються процеси перетворення окисленої форми глутатіону у відновлену внаслідок зниження активності NADPH-залежної глутатіонредуктази, яка використовує цей кофактор із пентозофосфатного шляху.

Співвідношення GSH/GSSG визначає оксидативний статус клітин та чітко регулюється двома ензимами – глутатіонпероксидазою та глутатіонредуктазою. За фізіологічних умов у клітинах підтримується відносно низький рівень GSSG. Це пов'язано з необхідністю обмежувати утворення змішаних з білками дисульфідів (Flohé, 2013).

У нашому випадку спостерігається зниження вмісту відновленого глутатіону на тлі підвищення його окисленої форми, що призводить до зниження редокс-індексу глутатіону (рис. 2.) з найнижчими значеннями в групі тварин, які за умов нестачі харчового протеїну споживали надмірну кількість сахарози.

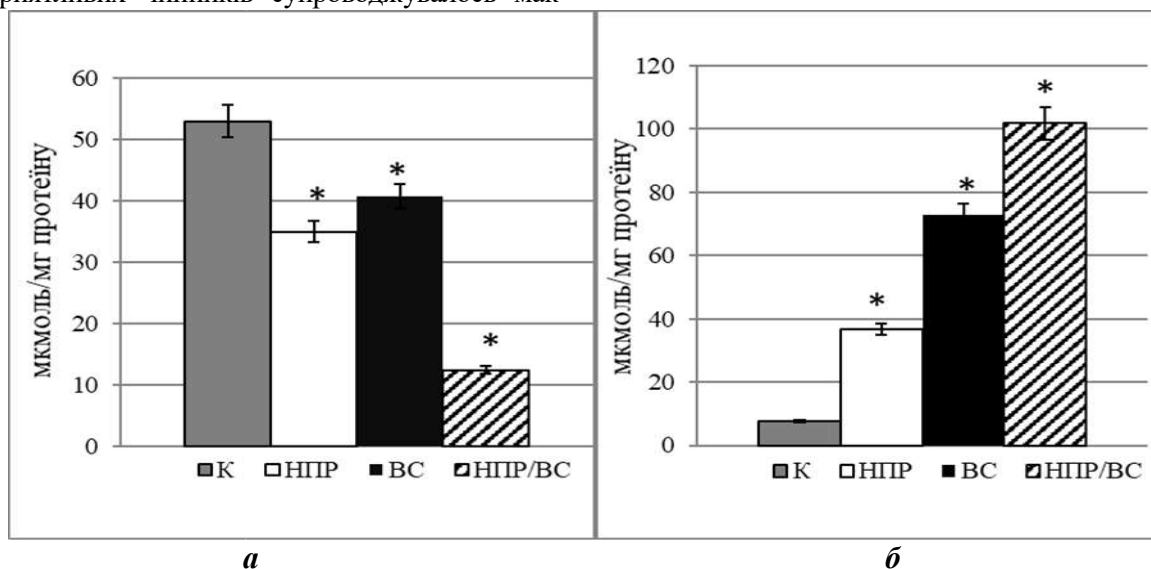


Рис. 1. Вміст відновленого (а) та окисненого (б) глутатіону в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами.

Fig. 1. The content of reduced (a) and oxidized (b) glutathione in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrients' supplementation in diet.

Примітка (тут і надалі): К – група тварин, які отримували повноцінний раціон; НПР – тварини, які утримувались на низькопротеїновому раціоні; ВС – тварини, які утримувались на високосахарозному раціоні; НПР/ВС – тварини, які перебували на низькопротеїновому/високосахарозному раціоні; * – статистично достовірна різниця порівняно з контролем, $P \leq 0,05$.

Note (hereinafter): C – animals that received a full semi-synthetic diet; LPD – animals that consumed a low-protein diet; HSD – animals that consumed a high-sucrose diet; LPD/HSD – animals that consumed a low-protein/high-sucrose diet; * – statistically significant difference compared with the control, $P \leq 0.05$.

Враховуючи високу концентрацію GSH у субклітинних структурах, за фізіологічних умов співвідношення GSH/GSSG розглядається як динамічний індикатор оксидативного стресу, тобто об'єктивного тесту прооксидантно/антиоксидантного балансу (Lushchak, 2012). Водночас це фактор редокс-сигналізації, що визначає транскрипцію ряду GSH-залежних ензимів, процеси проліферації, диференціації та апоптозу, а також механізм регуляції активності ферментів шляхом S-глутатіонування білків (Górný et al., 2019).

Для відновлення GSSG і, отже, рециклізації GSH в клітинах печінки існує спряжена система NADPH-глутатіонредуктази. Основне біологічне значення даного ензиму полягає у підтриманні в клітинах високого рівня стаціонарного рівня відновленого глутатіону. Функціонування ГР та ензимів, що лімітують швидкість пентозофосфатного шляху – глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та 6-фосфоглюконатдегідрогенази, в багатьох тканинах тісно взаємопов'язані (Stantont, 2012).

У зв'язку з цим наступним етапом роботи стало дослідження активності глутатіонредуктази в гепатоцитах щурів для встановлення однозначної відповіді зниження вмісту GSH, що може бути пов'язано або з активним використанням відновленої форми в трансферазній та пероксидазній реакціях, або недостатнім відновленням окисленої форми ГР.

Нами встановлено, що обмежене надходження харчового протеїну супроводжується активацією глутатіонредуктази (рис. 3.) та глюкозо-6-

фосфатдегідрогенази порівняно зі значеннями контролю (рис. 4.).

Враховуючи те, що для рециклізації GSH в клітинах печінки існує спряжена система NADPH-глутатіонредуктази – високоспецифічний ензим по відношенню до GSSG, то, вірогідно, такі зміни спрямовані на підтримання внутрішньоклітинного пулу GSH, синтез якого за умов дефіциту протеїну, як показано попередніми дослідженнями (Копильчук та ін., 2014), значно знижується.

Збільшення швидкості відновлення глутатіону за умов його дефіциту забезпечує більш високу швидкість обороту молекули глутатіону в процесі окисно-відновних взаємоперетворень. Активація глутатіонредуктази та підвищення спорідненості до субстрату засвідчують те, що глутатіонредуктаза не є лімітуючою ланкою у підтримці пулу відновленого глутатіону при виснаженні його пулу в печінці (Couto et al., 2016).

Відомо, що за нормальних умов близько 10 % глюкози окислюється через перетворення глюкозо-6-фосфату в 6-фосфоглюконолактон. Це окислення каталізується глюкозо-6-фосфатдегідрогеназою, коферментом якої служить NADP⁺. Даний ензим є першим і ключовим ферментом в ланцюзі перетворень глюкозо-6-фосфату. Для нормального функціонування пентозофосфатного шляху (ПФШ) необхідні активна NADP-залежна Г-6-ФДГ і активний механізм швидкого окислення NADPH. В гепатоцитах окислення NADPH абсолютно залежить від доступності окисленого глутатіону і від NADPH-зв'язаної глутатіонредуктази (Bakirezer et al., 2019).

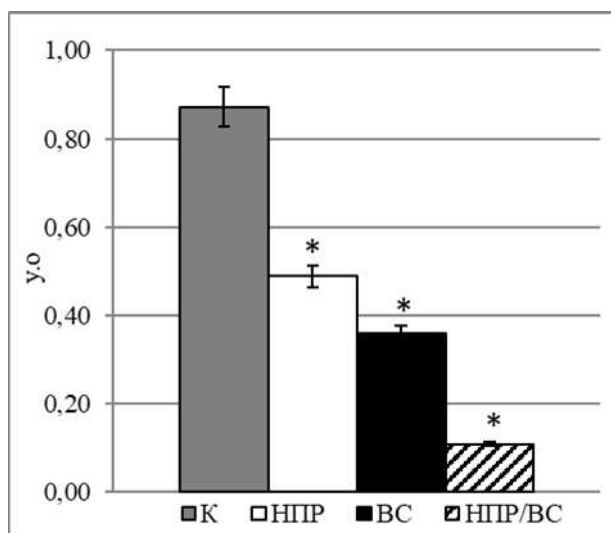


Рис. 2. Редокс-індекс глутатіону в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами.

Fig. 2. Glutathione redox ratio in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrients' supplementation in diet.

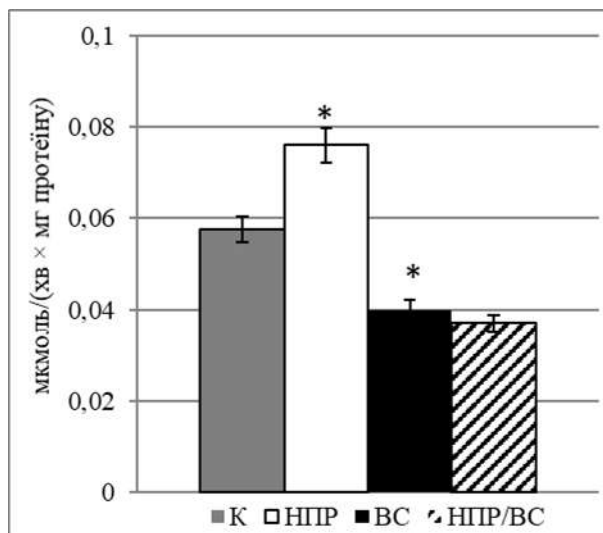


Рис. 3. Активність глутатіонредуктази в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами.

Fig. 3. Glutathione reductase activity in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrients' supplementation in diet.

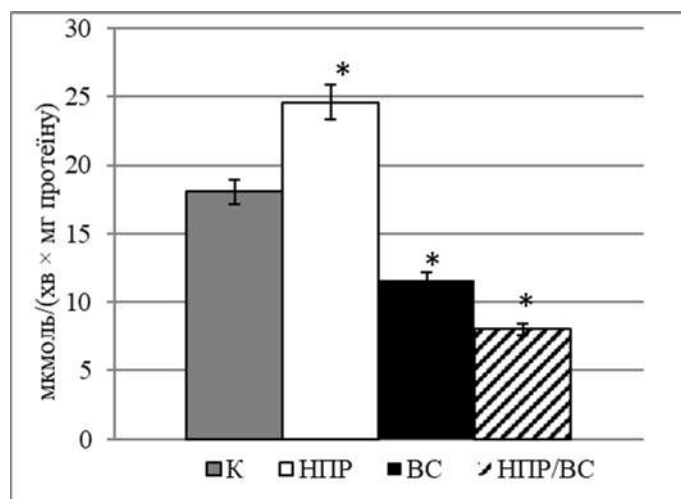


Рис. 4. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в гепатоцитах щурів за умов різного забезпечення харчового раціону нутрієнтами.

Fig. 4. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rats' hepatocytes under the conditions of different nutrients' supplementation in diet.

Таким чином споживання надмірної кількості сахарози, незалежно від надходження вмісту екзогенного протеїну, характеризується протилежними змінами активностей досліджуваних ензимів.

Зниження ГР-активності (рис. 3.) на тлі підвищення вмісту GSSG (рис. 1, б), який використовується ензимом як субстрат, вказує на пряму залежність встановлених функціональних змін від надходження NADPH. Водночас при дефіциті Г-6-ФДГ (рис. 4.), виявленому нами, концентрація NADPH, ймовірно, буде зменшуватися, що виступає передумовою зниження концентрації відновленого глутатіону.

Таким чином зменшення кількості NADPH, як наслідок встановлених змін, можна розглядати як одну із причин зниження вмісту відновленого глутатіону в клітинах печінки тварин за даних експериментальних умов.

Висновки. Отже, за умов споживання надмірного вмісту сахарози на тлі нестачі харчового протеїну в гепатоцитах щурів відбувається максимальне зниження вмісту GSH з одночасним зростанням рівня GSSG, що характеризується достовірним зменшенням редокс-індексу глутатіону та вказує на порушення окисно-відновної рівноваги у спряженій системі перетворення GSH ↔ GSSG.

Дефіцит харчового протеїну призводить до активації ензимів регенерації глутатіону – глутатіонредуктази та глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в гепатоцитах щурів, що, ймовірно, спрямовано на підтримку стабільного рівня GSH за умов порушення процесу його синтезу в γ -глутамілцистеїнсинтезній реакції.

Надмірне споживання сахарози виступає ключовим чинником зниження активності досліджува-

них ензимів у клітинах печінки щурів, що призводить до блокування першого етапу пентозофосфатного циклу.

Фінансування. Дана робота виконана у рамках науково-дослідної держбюджетної теми «Біохімічні та лазерно-поляриметричні параметри комплексного прогнозування метаболічних порушень» (№ державної реєстрації 0119U100717).

Список літератури:

1. Власова С.Н., Шабунина Е.И., Перслегина И.А. Активність глутатонзависимих ферментов еритроцитов при хронических заболеваниях у детей. Лаб. дело. 1990; 8: 19-21.
2. Іскра Р.Я. Особливості функціонування глутатіонової ланки антиоксидантного захисту і ліпідного обміну у вагітних самок щурів за дії хром цитрату. Біологічні студії. 2013; 7(1): 71-80. <https://doi.org/10.30970/sbi.0701.276>.
3. 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.
4. Копильчук Г.П., Николайчук І.М., Калюжна Ю.А. Особливості метаболічних перетворень гомоцистеїну та цистеїну в гепатоцитах щурів за умов нутритивного дисбалансу. Biological systems. 2020; 12(2): 141-149. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.141>.
5. Салига Н. О. Активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту в щурів за дії L-глутамінової кислоти. Ukr. Biochem. J. 2013; 85(4): 40-47. doi: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj85.04.040>.
6. Bachhawat A.K., Yadav S. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the gamma-glutamyl cycle. IUBMB Life. 2018; 70(7):585-592. doi: 10.1002/iub.1756.
7. Bakirezer S.D., Yaltirik C.K., Kaya A.H., Yilmaz S.G., Ozdogan S., Billur D., Isbir T. The Evaluation of Glutathione Reductase and Malondialdehyde Levels in

- Patients With Lumbar Disc Degeneration Disease. In *Vivo*. 2019; 33(3):811-814. doi: 10.21873/invivo.11543.
8. Chen Y., Manna S.K., Golla S., Krausz K.W., Cai Y., Garcia-Milian R., Chakraborty T., Chakraborty J., Chatterjee R., Thompson D.C., Gonzalez F.J., Vasiliou V. Glutathione deficiency-elicited reprogramming of hepatic metabolism protects against alcohol-induced steatosis. *Free Radic Biol Med*. 2019; 143:127-139. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.025.
 9. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016. 95:27-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
 10. 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*. 2015 - 2016; 201(6):464-472. doi: 10.1159/000446514.
 11. Flohé L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(5): 3139-42. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.020.
 12. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009; 30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
 13. Górny M., Wnuk A., Kamińska A., Kamińska K., Chwatko G., Bilska-Wilkosz A., Iciek M., Kajta M., Rogóż Z., Lorenc-Koci E. *Molecules*. 2019; 24(23):4253. doi: 10.3390/molecules24234253.
 14. Jensen T., Abdelmalek M.F., Sullivan S., Nadeau K.J., Green M., Roncal C., Nakagawa T., Kuwabara M., Sato Y., Kang D.H., Tolan D.R., Sanchez-Lozada L.G., Rosen H.R., Lanasa M.A., Diehl A.M., Johnson R.J. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2018; 68(5):1063-1075. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.019.
 15. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I. M. Basic components of glutathione system in rat erythrocytes under conditions of toxic damage on the background of an alimental protein lack. *Biological systems*. 2020. 12(1): 31-38. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.01.031>.
 16. Kravchenko L., Petrenko A., Shanina I., Fuller B. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes. *Cell Biol Int*. 2002; 26(11):1003-6. doi: 10.1006/cbir.2002.0951.
 17. Lind T., Lind P.M., Hu L., Melhus H. Studies of indirect and direct effects of hypervitaminosis A on rat bone by comparing free access to food and pair-feeding. *Ups J Med Sci*. 2018; 123(2):82-85. doi: 10.1080/03009734.2018.1448020.
 18. Lushchak V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical. *J Amino Acids*. 2012; 736837. doi: 10.1155/2012/736837.
 19. Meyer A.J., Hell R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res*. 2005; 86(3):435-57. doi: 10.1007/s1120-005-8425-1.
 20. Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18(13):1623-41. doi: 10.1089/ars.2012.4973.
 21. Oestreicher J., Morgan B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport (1). *Biochem Cell Biol*. 2019; 97(3):270-289. doi: 10.1139/bcb-2018-0189.
 22. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. 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.
 23. Stanhope K.L. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016; 53(1):52-67. doi: 10.3109/10408363.2015.1084990.
 24. Stantont R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*. 2012. 64(5): 362-369. doi: 10.1002/iub.1017.
- References:**
1. Vlasova S.N., Shabunina E.I., Pereslegina I.A. Aktivnost glutationzavisimiyh fermentov eritrotsitov pri hronicheskikh zabolevaniyah u detey. *Lab. delo*. 1990; 8: 19-21. (in Russian)
 2. Iskra R. Ya. The peculiarities of operation of glutathione component of antioxidant protection and lipid metabolism in pregnant rat females under the action of chromium citrate. *Studia Biologica*. 2013; 7(1): 71-80. <https://doi.org/10.30970/sbi.0701.276>. (in Ukrainian).
 3. 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. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*. 2014; 6(1): 10-15. (in Ukrainian).
 4. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Kaliuzhna Yu.A. The features of metabolic transformations of homocysteine and cysteine in rats' hepatocytes under the nutritional imbalance. *Scientific Herald of Chernivtsi University. Biology (Biological Systems)*. 2020; 12(2): 141-149. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.141>. (in Ukrainian).
 5. Salyha N.O. Activity of the glutathione system of antioxidant defense in rats under the action of L-glutamic acid. *Ukr. Biochem. J*. 2013; 85(4): 40-47. doi: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj85.04.040>. (in Ukrainian).
 6. Bachhawat A.K., Yadav S. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the gamma-glutamyl cycle. *IUBMB Life*. 2018; 70(7):585-592. doi: 10.1002/iub.1756.
 7. Bakirezer S.D., Yaltirik C.K., Kaya A.H., Yilmaz S.G., Ozdogan S., Billur D., Isbir T. The Evaluation of Glutathione Reductase and Malondialdehyde Levels in Patients With Lumbar Disc Degeneration Disease. In *Vivo*. 2019; 33(3):811-814. doi: 10.21873/invivo.11543.
 8. Chen Y., Manna S.K., Golla S., Krausz K.W., Cai Y., Garcia-Milian R., Chakraborty T., Chakraborty J., Chatterjee R., Thompson D.C., Gonzalez F.J., Vasiliou V. Glutathione deficiency-elicited reprogramming of hepatic metabolism protects against alcohol-induced steatosis. *Free Radic Biol Med*. 2019; 143:127-139. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.025.
 9. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016. 95:27-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.
 10. 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*. 2015 -

- 2016; 201(6):464-472. doi: 10.1159/000446514.
11. Flohé L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(5): 3139-42. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.10.020.
 12. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2009; 30(1-2):1-12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006.
 13. Górny M., Wnuk A., Kamińska A., Kamińska K., Chwatko G., Bilska-Wilkosz A., Iciek M., Kajta M., Rogóż Z., Lorenc-Koci E. *Molecules.* 2019; 24(23):4253. doi: 10.3390/molecules24234253.
 14. Jensen T., Abdelmalek M.F., Sullivan S., Nadeau K.J., Green M., Roncal C., Nakagawa T., Kuwabara M., Sato Y., Kang D.H., Tolan D.R., Sanchez-Lozada L.G., Rosen H.R., Lanaspa M.A., Diehl A.M., Johnson R.J. Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018; 68(5):1063-1075. doi: 10.1016/j.jhep.2018.01.019.
 15. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I. M. Basic components of glutathion system in rat erythrocytes under conditions of toxic damage on the background of an alimental protein lack. *Biological systems.* 2020. 12(1): 31-38. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.01.031>.
 16. Kravchenko L., Petrenko A., Shanina I., Fuller B. A simple non-enzymatic method for the isolation of high yields of functional rat hepatocytes. *Cell Biol Int.* 2002; 26(11):1003-6. doi: 10.1006/cbir.2002.0951.
 17. Lind T., Lind P.M., Hu L., Melhus H. Studies of indirect and direct effects of hypervitaminosis A on rat bone by comparing free access to food and pair-feeding. *Ups J Med Sci.* 2018; 123(2):82-85. doi: 10.1080/03009734.2018.1448020.
 18. Lushchak V.I. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical. *J Amino Acids.* 2012; 736837. doi: 10.1155/2012/736837.
 19. Meyer A.J., Hell R. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res.* 2005; 86(3):435-57. doi: 10.1007/s11120-005-8425-1.
 20. Nagy P. Kinetics and mechanisms of thiol-disulfide exchange covering direct substitution and thiol oxidation-mediated pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2013; 18(13):1623-41. doi: 10.1089/ars.2012.4973.
 21. Oestreicher J., Morgan B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport (1). *Biochem Cell Biol.* 2019; 97(3):270-289. doi: 10.1139/bcb-2018-0189.
 22. Reeves P.G., Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. 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.
 23. Stanhope K.L. Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2016; 53(1):52-67. doi: 10.3109/10408363.2015.1084990.
 24. Stantont R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life.* 2012. 64(5): 362-369. doi: 10.1002/iub.1017.

THE ACTIVITY OF GLUTATHIONE REGENERATION ENZYMES IN RATS' HEPATO-CYTES UNDER THE CONDITIONS OF NUTRITIONAL IMBALANCE

H. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, V. Z. Soroka

In the present study, the investigation of the redox status of the glutathione system and the activity of glutathione regeneration enzymes in rats' hepatocytes under the conditions of different protein and sucrose supplementation: the content of reduced and oxidized forms of glutathione, glutathione redox ratio, glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity are presented. During the experiment, the experimental animals consumed a semi-synthetic diet AIN-93 in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition. Isolation of hepatocytes was performed by non-enzymatic method with Hanks' solution with the addition of 2 mM EDTA. The concentration of the reduced glutathione was investigated using Elman's reagent after the deproteinization of the samples on a CARY 60 spectrophotometer (USA) at a wavelength of 412 nm. To determine the content of oxidized glutathione, zinc dust was added to the reaction mixture in order to convert the oxidized form to the reduced one. Glutathione reductase activity in hepatocytes was determined by the oxidation rate of $NADPH^+ \cdot H^+$. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was investigated by $NADP^+$ reduction rate at 340 nm. A maximum decrease in GSH content (at 4.5 times compared to control) with a simultaneous increase in GSSG levels (at 12 times compared with control) in rats' hepatocytes was found under the conditions of consumption of excessive sucrose content on the background of deficiency of dietary protein. These results are characterized by a significant decrease in the glutathione redox ratio and indicates a disruption of the redox balance in the conjugate conversion system $GSH \leftrightarrow GSSG$. Deficiency of dietary protein leads to the activation of glutathione regeneration enzymes - glutathione reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in rats' hepatocytes, which is probably aimed at maintaining a stable level of GSH under the conditions of disruption of its synthesis in γ -glutamylcysteine synthetase reaction. Excessive consumption of sucrose is a key factor in reducing the activity of the studied enzymes in rats' liver cells, which leads to the blocking of the first stage of the pentose phosphate cycle. Therefore, the decrease in the amount of NADPH, as a consequence of the established changes, can be considered as one of the reasons for the decrease in the content of reduced glutathione in animals' liver cells under the experimental conditions.

Keywords: glutathione, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glutathione redox ratio, hepatocytes, high-sucrose diet, alimentary protein deprivation.

Отримано редколегією 07.04.2021