УДК [612.351:546.172.6]+[612.396-022.257+612.398-022.252] *doi:10.31861/biosystems2020.02.187*

ВМІСТ ОКСИДУ АЗОТУ ТА S-НІТРОЗОТІОЛІВ У КЛІТИНАХ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ РІЗНОГО ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ХАРЧОВОГО РАЦІОНУ МАКРОНУТРІЄНТАМИ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. НИКОЛАЙЧУК, О. М. КУЗЯК

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

У даній роботі представлені дослідження вмісту оксиду азоту та низькомолекулярних S-нітрозотіолів у мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки щурів за умов аліментарної депривації протеїну, споживання надмірного вмісту сахарози та поєднаної дії двох несприятливих чинників.

З метою моделювання низькопротеїнової дієти тварини протягом 28 днів отримували ізокалорійний раціон, що містив 4,7 % протеїну, 10 % жирів та 81,3 % вуглеводів (крохмаль – 66,3 %, сахароза – 10 %, целюлоза – 5 %), розрахований згідно з рекомендаціями American Institute of Nutrition. До складу високосахарозного раціону входили 14 % протеїну, 10 % жирів, 72 % вуглеводів (крохмаль – 37 %, сахароза – 30 %, целюлоза – 5 %). Мітохондріальну та цитозольну фракцію клітин печінки щурів отримували методом препаративного диференційного центрифугування.

Вміст оксиду азоту оцінювали уніфікованим методом шляхом визначення вмісту NO_2^-, який є стабільним метаболітом оксиду азоту. Оскільки NO інактивується в оксидазній реакції з перетворенням в нітрит або нітрат, який швидко метаболізується, то вміст оксиду азоту оцінювали за зміною NO_2^-. Концентрацію S-нітрозотіолів реєстрували відповідно шляхом визначення концентрації нітрит-аніону до та після додавання іонів Hg^{2+}, який шляхом модифікації S–N-зв'язків каталізує вивільнення S-нітрозильних тіолів оксиду азоту.

Встановлено, що в обох субклітинних фракціях печінки дослідних груп щурів спостерігається зростання вмісту NO порівняно зі значеннями контролю. Проте ключовим чинником зареєстрованих змін в мітохондріях печінки тварин можна вважати недостатність протеїну в харчовому раціоні (дефіцит протеїну в дієті призводить до зростання рівня оксиду азоту в 3-4 рази), тоді як в цитозолі – надмірне споживання сахарози (підвищення в 3-5 разів). Щодо рівня S-нітрозотіолів, то в досліджуваних фракціях спостерігаються різноспрямовані зміни їх концентрації. Так, підвищення вмісту нітрозильних похідних в мітохондріях клітин печінки щурів із одночасним зниженням їх рівня в цитозолі вказує на дисметаболічні порушення в системі транспорту та депонування оксиду азоту, що може призводити до розвитку нітрозативного стресу за даних експериментальних умов.

Ключові слова:оксид азоту, S-нітрозотіоли, нітрозативний стрес, аліментарна депривація протеїну, високосахарозний раціон

Вступ. Сьогодні надлишкове споживання легкозасвоюваних вуглеводів на тлі нестачі харчового протеїну є досить поширеним явищем. Раціон, який містить продукти харчування з високим глікемічним індексом, сповільнює процеси в шлунково-кишковому тракті, зменшує адсорбцію глюкози, збільшуючи рівень толерантності клітин організму до її концентрації (Козонова, 2015; Van Sundert et al., 2020).

Важливою ланкою патогенезу сформованих метаболічних порушень виступає дисфункція регуляторної системи оксиду азоту (NO). Більшість дослідників значну увагу приділяються ролі оксиду азоту як одному із трансмітерів внутрішньо- та міжклітинної сигналізації (Möller et al., 2019). Доведено, що NO проявляє різнобічну дію за цих умов: з одного боку, виступає компонентом запальних процесів, із іншого, – найважливішим медіатором клітинного метаболізму. Універсальність механізмів апоптозу та оксидативного стресу передбачає участь оксиду азоту як в індукції, так і в регуляції даних процесів. NO є нетиповою сигнальною молекулою з високою реакційною здатністю, включається в сигнальну трансдукцію і відповідає за широкий діапазон функцій (Calcerrada et al., 2011). Будь-які відхилення у продукції NO та дисбаланс активних форм Нітрогену можуть відображатися на стані гемостазу, що проявляється порушеннями коагуляції при патологічному процесі. Прояв захисної або пошкоджувальної дії NO пов'язують з утворенням великої кількості продуктів його метаболізму, які мають різну біологічну активність (Палагіна та ін., 2016; Speckmann et al., 2016). Нині немає чітких уявлень щодо впливу цієї молекули та її метаболітів на біохімічні механізми розвитку патологічних процесів за умов нутрієнтоасоційованих станів.

Окрім цього, NO вступає в реакцію з супероксидним аніон-радикалом (O_2^-), внаслідок чого утворюється пероксинітрит ($ONOO^-$). $ONOO^-$ є потужним прооксидантом та цитотоксином, оскільки значно посилює деструкцію клітинних структур шляхом модифікації протеїнів, зокрема за залишками тирозину, індукцію пероксидного окислення ліпідів, порушення у внутрішньоклітинній сигналізації, призводячи до поглиблення оксидативно-нітрозативного стресу (Ascenzi et al., 2018).

NO здатний стимулювати внутрішньоклітинні сигнали шляхом активації протеїнкіназ або реагуючи з активними формами кисню та іонами металів. Основними мішенями NO у клітинах є протеїнкінази, фосфатази та фактори транскрипції, які в активному чи алостеричному центрах містять SH-групи або іони металів (Bruand et al., 2019).

Доведеним фактом є те, що в клітинах і тканинах регуляторною активністю володіє не лише оксид азоту, але й численні продукти його перетворень, серед яких особливе місце займають S-нітрозотіоли. S-нітрозотіоли – стабільні метаболіти оксиду азоту, які утворюються шляхом зв'язування NO з тіоловими групами амінокислот, пептидів або протеїнів, здійснюють стабілізацію та транспорт оксиду азоту від клітин-донорів до клітин-мішеней (Ganzarolli de Oliveira, 2016). Вивільняючи або депонуючи NO, S-нітрозотіоли виступають основним шляхом утилізації, що модулює потоки утворення оксиду азоту в організмі та запобігає його інактивації (Broniowska et al., 2012). Вважається, що білкові нітрозотіоли виступають стабільними депо оксиду азоту, низькомолекулярні форми – переносниками NO через клітинні мембрани, однак це питання потребує додаткового дослідження (Stomberski et al., 2019).

З огляду на вищезазначене мета даної роботи – дослідження вміст оксиду азоту та S-нітрозотіолів у мітохондріальній та цитозольній фракціях печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні.

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

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

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

Дослідні тварини були поділені на групи:

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

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

Мітохондріальну та цитозольну фракції клітин печінки щурів отримували методом диференційного препаративного центрифугуваня, як описано раніше в літературі (Kopylchuk et al., 2020).

Вміст оксиду азоту оцінювали уніфікованим методом шляхом визначення вмісту NO_2^-, який є стабільним метаболітом оксиду азоту. Оскільки NO швидко інактивується в оксидазній реакції з перетворенням в нітрит або нітрат, який швидко метаболізується, то вміст оксиду азоту правомірно оцінювати за зміною NO_2^- (Curran R. et al., 2001).

Вміст S-нітрозотіолів у попередньо депротеїнізованій кислоторозчинній мітохондріальній та цитозольній фракціях реєстрували відповідно до методичних рекомендацій, описаних раніше (Марченко та ін., 2012). Принцип методу базується на визначенні концентрації NO_2^- до та після додавання іонів Hg^{2+}, який шляхом модифікації S–N-зв'язків каталізує вивільнення S-нітрозильних тіолів оксиду азоту.

Концентрацію протеїну в дослідних зразках визначали за методом Лоурі (Lowry O. et al., 1951).

Статистичне опрацювання результатів досліджень здійснювали з використанням програми *Microsoft Excel*. Для оцінки вірогідності різниці

між статистичними характеристиками двох альтернативних сукупностей даних обчислювали коефіцієнт Стьюдента. Вірогідною вважали різницю при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$).

Результати та їх обговорення. Нами встановлено, що в мітохондріальній фракції клітин печінки усіх дослідних груп тварин спостерігається підвищення концентрації оксиду азоту порівняно зі значеннями контролю (рис. 1). Максимальне продукування NO (в 4 рази перевищує контрольні величини) зареєстровано в мітохондріях щурів, які на тлі екзогенної нестачі харчового протеїну отримували надмірну кількість легкозасвоюваного вуглеводу – сахарози. Проте, як видно з даного рисунку, ключовим чинником встановлених змін виступає аліментарна депривація протеїну.

За даними літератури останніх років (Новиков и др., 2016) увагу дослідників привертає оксид азоту, що продукується саме за участю мітохондріальної NO-синтази (mtNOS). Нещодавно на внутрішній мембрані мітохондрій виявлено конститутивну форму синтази оксиду азоту, яка задіяна в зворотному інгібуванні цитохромоксидази та функціонально зв'язана з I комплексом дихального ланцюга. Але за основними характеристиками mtNOS більш подібна до індуцибельної NOS, а не конститутивної ізоформи родини NO-синтаз. Водночас при порівнянні швидкості продукції NO інтактними мітохондріями, мітохондріальним гомогенатом і субмітохондріальними частинками, за експериментальними дослідженнями (Qingdong et al., 2006) встановлено, що mtNOS розташована на внутрішній мембрані мітохондрій, тоді як iNOS є цитозольним ензимом. Ймовірно, надмірне утворення NO, встановлене нами за даних експериментальних умов, зумовлене активацією мітохондральної NO-синтази. Однак питання про те, що являє собою mtNOS – окрему ізоформу ферменту чи модифіковану під час трансляції або після неї індуцибельну NOS, залишається відкритим і по-різному трактується авторами (Dynnik et al., 2020).

Слід зазначити, що за умовах виснаження внутрішньоклітинного пулу L-аргініну, як було встановлено раніше при аліментарній депривації протеїну (Kopylchuk et al., 2017) мітохондріальна NOS може переключитися на утворення активних форм кисню замість NO. Як наслідок дії оксиду азоту та його цитотоксичних дериватів відбувається відкриття мітохондріальної мегапори (mPTP), експресія і вихід у цитозоль проапоптичних білків, що узгоджується з попередніми роботами наукової групи та підтверджується підвищенням вмісту цитохрому *c* за даних експериментальних умов.

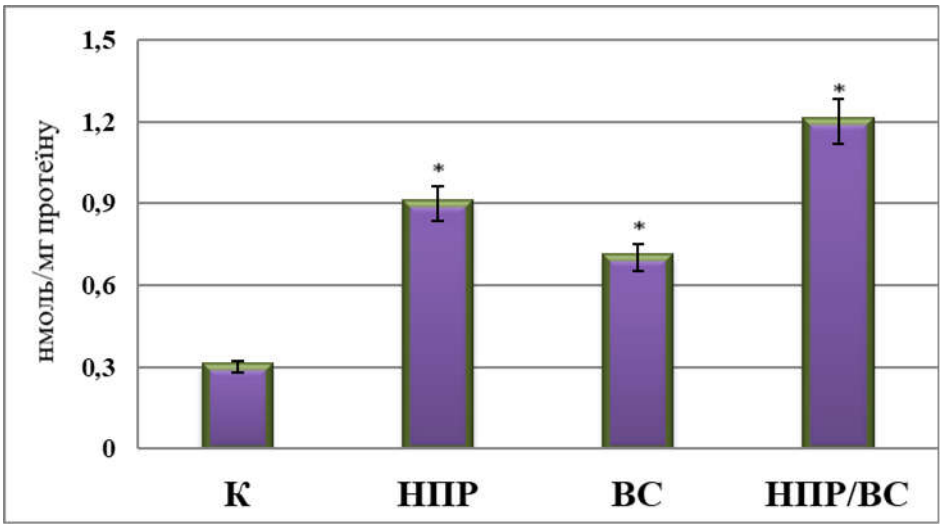

Рис. 1. Вміст оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Fig. 1. The content of nitric oxide in the hepatic mitochondrial fraction of rats under the conditions of nutrients imbalance

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

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

Мітохондріальна пора являє собою канал, що проходить крізь обидві мітохондріальні мембрани і складається з трьох білків: транслокатора аденілових нуклеотидів, потенціалозалежного аніонного каналу (порину) і бензодіазепінового рецептора (Колесник та ін., 2014). Коли цей комплекс зв'язується з Ca^{2+}, через мембранну пору можуть проходити речовини з невеликою молекулярною масою. Це призводить до зниження мембранного потенціалу і набухання матриксу; цілісність зовнішньої мембрани неминуче порушується і з міжмембранного простору в цитоплазму виходять білки апоптозу. Нітрозилювання білків за залишками тирозину, здійснюване пероксинітритом ($ONOO^-$) – продуктом взаємодії NO з супероксидом, – може мати негативні функціональні наслідки, оскільки пригнічує фосфорилювання тирозину, тобто порушує деякі шляхи передачі сигналу в клітині. Пероксинітрит може нітрозилювати і цитохром *c* у мітохондріях, він стає нездатним підтримувати перенесення електронів у дихальному ланцюгу і не відновлюється аскорбатом. Оскільки одночасно відбувається вихід цитохрому *c* (в тому числі і нітрованого) у цитоплазму, можна припустити участь такого нітрозилювання і в інших сигнальних процесах (Feng et al., 2014).

Інтермедіати тіол-дисульфідної системи можуть виступати транпорте-рами щодо NO, тим самим підвищуючи його біодоступність. Окрім того, більшість тіолів – глутатіон, цистеїн, метіонін – здатні значно обмежувати цитотоксичність оксиду азоту та його дериватів, збільшуючи таким чином шанс клітини вижити за умов патологічного процесу (Broniowska et al., 2012).

За даними літератури (Speckmann et al., 2016), пероксинітрит гальмує проходження взаємодіючих метаболічних циклів метіоніну і цистеїну, пригнічуючи активність ключових ензимів, які регулюють рівень цистеїну, та підвищуючи утворення гомоцистеїну, що узгоджується з результатами паралельно проведених досліджень в розрізі даної тематики.

Враховуючи те, що біологічний час напівжиття оксиду азоту в паренхімних (екстраваскулярних) тканинах не перевищує 2 секунди та залежить від концентрації супероксидних радикалів, стабілізація молекули NO відбувається шляхом включення її до складу S-нітрозотіолів чи динітрозильних комплексів із залізом та тіоловими лігандами, що є основою формування фізіологічно активного депо NO (Zhang et al., 2005).

Біологічні функції S-нітрозотіолів зумовлені наявністю в них однієї або відразу декількох властивостей: легке відщеплення оксиду азоту; участь в реакціях S-перенітрозування та S-тіолювання; безпосередня дія S-нітрозотіолів на рецептори (Keszler et al., 2016). За фізіологічних умов утворення S-нітрозотіолів сприяє депонуванню і транспортуванню NO, підвищуючи його біодоступність і перешкоджаючи утворенню пероксинітриту.

Щодо вмісту S-нітрозотіолів, то результати проведених нами досліджень за даних експериментальних умов, засвідчують аналогічну тенденцію змін даного показника по відношенню до кількості оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів (рис. 2).

Дослідженнями науковців (Ganzarolli de Oliveira et al., 2016; Stomberski et al., 2019) встановлено, що транспорт NO відбувається з утворенням одного з дериватів оксиду азоту – N_2O_3, який нітрозилює тіоли. N_2O_3 найчастіше взаємодіє з цистеїном та глутатіоном з утворенням S-нітрозоцистеїну й S-нітрозоглутатіону. Вважається, що S-нітрозоглутатіон є основною транспортною формою перенесення NO. За участю дисульфідізомерази оксид азоту може вивільнятися.

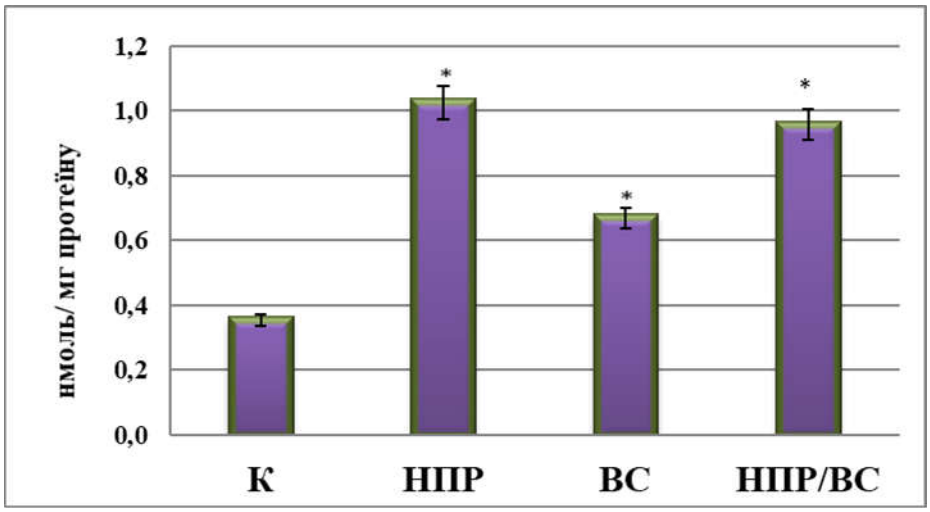

Рис. 2. Вміст S-нітрозотіолів у мітохондріальній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Fig. 2. The content of S-nitrosothiols in the hepatic mitochondrial fraction of rats under the conditions of nutrients imbalance

Виходячи з отриманих результатів, можна говорити про те, що підвищення концентрації оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів, вірогідно, пов'язане не лише з активацією індуцибельної NO-синтази, а й високим вмістом депонуючих форм NO – S-нітрозотіолів, які можуть неконтрольовано вивільняти даний метаболіт.

Слід відмітити, що дещо інша тенденція змін вмісту оксиду азоту простежується в цитозольній фракції клітин печінки дослідних тварин (рис. 3). Зростання рівня даного показника на за умов аліментарного дефіциту протеїну приблизно на 40 % порівняно з контролем може відбуватися за рахунок активації сигнальних систем з метою реалізації потенційної дії NO як внутрішньоклітинного посередника (Ford et al., 2020). Водночас максимальне зростання даного показника спостерігалося за умов надходження в організм тварин надмірної кількості сахарози (на 67 % у щурів, які споживали надлишок сахарози при повноцінному забезпеченні раціону протеїном та на 72 % в протеїнодефіцитних тварин, що отримували надмірну кількість легкозасвоюваного вуглеводу відповідно порівняно з контролем (рис. 3).

Гіперглікемія, яка розвивається на тлі споживання високосахарозного раціону, що показано попередніми дослідженнями, активує поліольний шлях обміну глюкози з підвищеним накопиченням у тканинах продуктів – сорбітолу та фруктози. За фізіологічних умов перетворення глюкози в сорбітол незначне – до 1% кількості клітинної глюкози. При порушенні обміну глюкози, що спостерігається при гіперглікемії, перетворення її в сорбітол зростає до 7-8 %. За дії ключового ензиму сорбітолового шляху – альдозоредуктази – нефосфорильована глюкоза конвертується в сорбітол, а останній за участю сорбітолдегідрогенази – у фруктозу.

Підвищення активності альдозоредуктази, як показано дослідженнями останніх років (Bae et al., 2020) призводить до виснаження NADPH та, як наслідок, регенерації відновленого глутатіону, що узгоджується із попередніми дослідженнями змін компонентів глутатіонової системи в гепатоцитах щурів при споживанні надлишкової кількості вуглеводів.

За умов порушення функціонування антиоксидантної системи посилюються процеси ПОЛ, внаслідок чого різко зростає кількість продуктів вільнорадикального окислення і пероксидів. Інтенсифікація утворення активних метаболітів кисню та азоту також стимулюється кінцевими продуктами глікозилювання (Maniam et al., 2015), що є ще одним свідченням надмірного продукування оксиду азоту в цитозольній фракції клітин печінки щурів (рис. 3).

Необхідно врахувати, що за умов гіперпродукції NO може безпосередньо зв'язуватися в тканинах організму з негемовим залізом і парними тіоловими групами низькомолекулярних лігандів, пептидів і білків, утворюючи динітрозильні комплекси негемового заліза (Dinitrosyl Iron Complex, DNIC). Якщо S-нітрозотіоли вважаються депонуючою формою депо NO, то DNIC в літературі (Zhang et al., 2005; Broniowska et al., 2012) описують як транспортну форму оксиду азоту.

Проаналізувавши отримані результати досліджень, представлені на рис. 4, слід зазначити, що в цитозольній фракції клітин печінки щурів усіх дослідних груп спостерігається зниження вмісту S-нітрозотіолів. Споживання надлишку сахарози на тлі обмеженого надходження екзогенного протеїну супроводжується максимальним зниженням вмісту досліджуваних метаболітів (рис. 4).

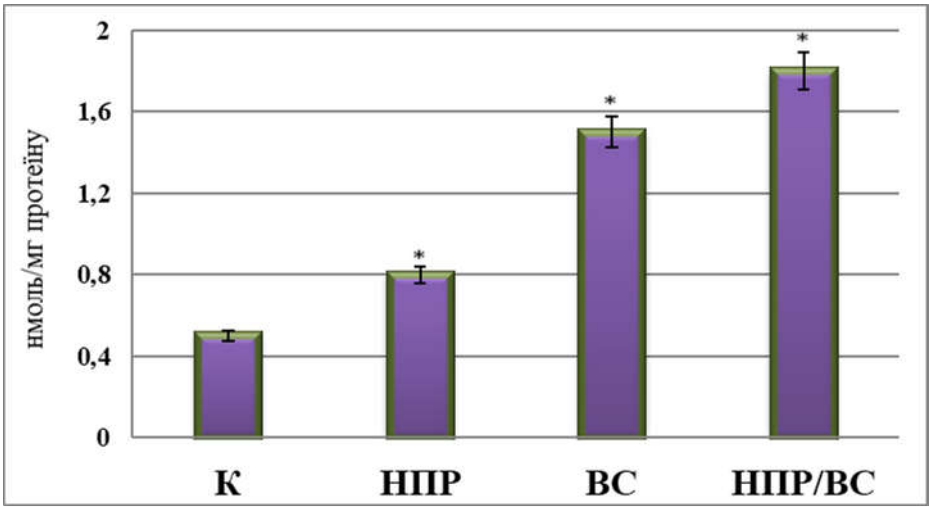

Рис. 3. Вміст оксиду азоту в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Fig. 3. The content of nitric oxide in the hepatic cytosolic fraction of rats under the conditions of nutrients imbalance

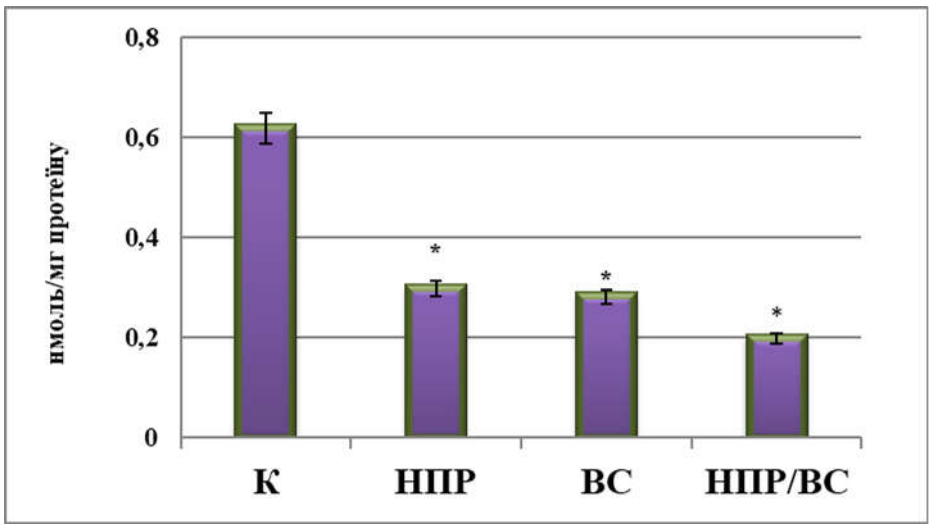

Рис. 4. Вміст S-нітрозотіолів у цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов дисбалансу нутрієнтів у харчовому раціоні

Fig. 4. The content of S-nitrosothiols in the hepatic cytosolic fraction of rats under the conditions of nutrients imbalance

Можна припустити, що швидше за все, в цитозолі гепатоцитів оксид азоту знаходиться у вільному первинному вигляді, формі своїх дериватів або динітрозильних комплексів негемового заліза, які забезпечують транспорт даної молекули.

Ендогенне утворення *DNIC* стає можливим через присутність в цито-плазмі клітин так званого вільного фонду заліза (ВФЗ). Це залізо знаходиться в вигляді феро-іона, слабозв'язаного з різними низькомолекулярними органічними хелаторами (цитратом, ізоцитратом, піруватом, фосфатом, ATP, ADP), а також SH-групами білків, ліпідами мембран тощо. ВФЗ заповнюється шляхом ендоцитозу Fe^{3+}-трансферину (Fe^{3+}-Tf) в ендосоми клітин. Транспорт Fe^{3+}-Tf з позаклітинного середовища до ендосом здійснюється за допомогою трансферинових рецепторів.

За умов інтенсифікації ендогенного синтезу NO вільне залізо легко утворює *DNIC* з цистеїном і глутатіоном. Ці низькомолекулярні *DNIC* є більш стабільними утвореннями, ніж NO. Якщо час існування оксиду азоту в біологічному середовищі реєструється секундами внаслідок його швидкої взаємодії з супероксидом, то нм*DNIC* стійкі протягом декількох хвилини (Keszler et al., 2017). Тому вони можуть переміщатися між внутрішньоклітинними компартментами та клітинами, здійснюючи паракринну функцію як донори NO і не тільки. Порівняно з NO та низькомолекулярними S-нітрозотіолами *DNIC* є потужнішими нітрозилюючими агентами, що ефективніше взаємодіють з білками. Мішенями атаки DNIC можуть бути вільні SH-групи білків, гістидин, аспартат та глутамін. При цьому в білках можуть утворюватися *DNIC*, S-нітрозотіоли та N-нітрозотіоли. Однією з мішеней дії нм*DNIC* є група білків, які містять негемове залізо у вигляді залізосірчаних кластерів. До них відносяться мітохондріальні білки електронтранспортного ланцюга, цисаконітаза, а також ензими ксантиноксидаза, альдегідоксидаза, глутаматсинтаза тощо (Bae et al., 2019).

Висновки. Отже, ключовим чинником посиленого утворення оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів за умов розбалансованості харчових раціонів виступає обмежене надходження екзогенного протеїну, що супроводжується аналогічними змінами вмісту S-нітрозотіолів. Інтенсифікація продукування NO в цитозолі гепатоцитів тварин на тлі зниження низькомолекулярних нітрозо тіолів вказує на дисметаболічні зміни в системі транспорту та депонування NO, а саме на ймовірність перебування оксиду азоту у вільному вигляді, формі своїх дериватів або динітрозильних комплексів негемового заліза.

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

Список літератури:

1. Козонова Ю.О. Нутрієнтний дисбаланс раціону як основний фактор у розвитку метаболічного синдрому. *Харчова наука та технологія.* 2015; 9 (4): 9–15. doi: 10.15673/2073-8684.4/2015.55863
2. Колесник Ю.М., Чекман І.С., Мазур І.А., Белєнічев І.Ф., Горчакова Н.О., Нагорна О.О. Механізми розвитку ендотеліальної дисфункції та пошук ендотеліопротекторів. *Журнал НАМН України.* 2014; 20(3): 289–299.

3. Марченко М. М., Копильчук Г. П., Бучковська І. М. Рівень S-нітрозотіолів у клітинах печінки мишей при нестачі вітаміну А та частковій гепатектомії. *Вісник Одеського національного університету.* 2012; 17(29): 30–37.
4. Новиков В. Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Митохондриальная синтаза оксида азота и ее роль в механизмах адаптации клетки. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии.* 2016. 14(2): 38–46. doi: 10.17816/RCF14238-46
5. Палагіна І. А., Кудря М. Я., Лалименко О. С. Роль метаболітів оксиду азоту при дії субтоксичних доз сукцинамідів на стан гемостазу. *Фізіол. журн.* 2016; Т. 62(6): 34–42.
6. Сибірна Н.О., Люта М.Я., Климишин Н.І. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. *Біологічні студії.* 2010; Т. 4(1): 143–160.
7. Ascenzi P., Coletta M. Peroxynitrite Detoxification by Human Haptoglobin:Hemoglobin Complexes: A Comparative Study. *J Phys Chem B.* 2018; 122(49): 11100–11107. doi: 10.1021/acs.jpcb.8b05340.
8. Bae J., Kumazoe M., Fujimura Y., Tachibana H. Diallyl disulfide potentiates anti-obesity effect of green tea in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity. *J Nutr Biochem.* 2019; 64: 152–161. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.10.014
9. Broniowska K.A., Hogg N. The chemical biology of S-nitrosothiols. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 17(7): 969–80. doi: 10.1089/ars.2012.4590.
10. Bruand C., Meilhoc E. Nitric oxide in plants: pro- or anti-senescence. *J Exp Bot.* 2019; 70(17): 4419–4427. doi: 10.1093/jxb/erz117
11. Calcerrada P., Peluffo G., Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(35): 3905–3932. doi: 10.2174/138161211798357719
12. Curran R. D., Ferrari F. K., Kispert P. H., Stadler J., Stuehr D. J., Simmons R. L., Billiar T. R. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J.* 2001. 5(7): 2085–2092. doi: 10.1096/fasebj.5.7.1707021
13. Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* 2020; 287(8): 1525–1536. doi: 10.1111/febs.15090
14. Ellacott K., Morton G. J., Woods S. C., Tso P., Schwartz M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab.* 2010; 12(1): 10–17. doi: 10.1016/j.cmet.2010.06.001
15. Feng Ch., Chen L., Li W., Elmore B.O., Fan W., Sun X. Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*. 2014; 130: 130–40.
16. Fernandes-Lima F., Monte T. L. Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First Hit of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs*. 2016; 201(6): 464–472. doi: 10,1159 / 000446514
17. Ford P.C., Miranda K.M. The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. *Nitric Oxide.* 2020; 103: 31–46.
18. Ganzarolli de Oliveira M. S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016; 119(30): 49–56.
19. Keszler A., Diers A.R., Ding Z., Hogg N. Thiolate-based dinitrosyl iron complexes: Decomposition and detection and differentiation from S-nitrosothiols. *Nitric Oxide.* 2017; V. 65: 1–9.
20. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Lylyk I.S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(1): 113–119.
21. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Zhuretska O.M. Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr. Biochem. J.* 2017; 89(2): 92–98.
22. Maniam J., Antoniadis C.P., Morris M.J. The effect of early-life stress and chronic high-sucrose diet on metabolic outcomes in female rats. *Stress.* 2015; 18(5): 524–37.
23. Möller M.N., Rios N., Trujillo M., Radi R., Denicola A., Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem.* 2019; 294(40): 14776–14802.
24. Qingdong K., Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(5):1469–1480.
25. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115(23): 5839–5848.
26. Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939 – 1951.
27. Speckmann B., Steinbrenner H., Grune T., Klotz L.O. Peroxynitrite: From interception to signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2016; V. 595: 153–160.
28. Stomberski C.T., Hess D.T., Stamler J.S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2019; V. 30(10): 1331–1351. doi: 10.1089/ars.2017.7403
29. Van Sundert K., Radujković D., Cools N., De Vos B., Etzold S., Fernández-Martínez M., Janssens I.A., Merilä P., Peñuelas J., Sardans J., Stendahl J., Terrer C., Vicca S. Towards comparable assessment of the soil nutrient status across scales-Review and development of nutrient metrics. *Glob Chang Biol.* 2020; 26(2): 392–409. doi: 10.1111/gcb.14802
30. Zhang Y., Hogg N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med.* 2005; V. 38(7): 831–832. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.016

References:

1. Kozonova J. Diet nutrition disbalance as a major factor in the metabolic syndrome progression. *Food science and technology*. 2015; 9 (4): 9–15. doi:10.15673/2073-8684.4/2015.55863
2. Kolesnik Yu. M., Chekman I.S., Mazur I.A., Belenichev I. F., Gorchakova N. A., Nagornaia E. A. Mechanisms of development of endothelial

dysfunction and search for endothelioprotectors. *Zhurnal NAMN Ukrainy*. 2014; 20(3): 289–299.
3. Marchenko M. M., Kopylchuk G. P., Buchkovska I. M. The level of s-nitrosothiols in the cells liver of mice of vitamin A deprivation and partial hepatectomy. *Odesa National University herald.* 2012; 17(29): 30–37.
4. Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova E.V. Mitochondrial nitric oxide synthase and its role in the mechanisms of cell adaptation to hypoxia. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2016; 14(2): 38–46. doi: 10.17816/RCF14238-46
5. Palagina I.A., Kudria M.Y., Lalymenko O.S. Role of nitric oxide metabolites within the impact of the subtoxic succinamides doses on state of hemostasis. *Fiziolohichnyi zhurnal.* 2016; 62(6): 34–42.
6. Sybirna N. O., Lyuta M. Ya., Klymyshyn N. I. Molecular mechanisms of nitric oxide depositionin erythrocytes. *Studia Biologica*. 2010; 4(1): 143–160
7. Ascenzi P., Coletta M. Peroxynitrite Detoxification by Human Haptoglobin:Hemoglobin Complexes: A Comparative Study. *J Phys Chem B.* 2018; 122(49): 11100–11107. doi: 10.1021/acs.jpcb.8b05340
8. Bae J., Kumazoe M., Fujimura Y., Tachibana H. Diallyl disulfide potentiates anti-obesity effect of green tea in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity. *J Nutr Biochem.* 2019; 64: 152–161. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.10.014
9. Broniowska K.A., Hogg N. The chemical biology of S-nitrosothiols. *Antioxid Redox Signal.* 2012; 17(7): 969–80. doi: 10.1089/ars.2012.4590.
10. Bruand C., Meilhoc E. Nitric oxide in plants: pro- or anti-senescence. *J Exp Bot.* 2019; 70(17): 4419–4427. doi: 10.1093/jxb/erz117
11. Calcerrada P., Peluffo G., Radi R. Nitric oxide-derived oxidants with a focus on peroxynitrite: molecular targets, cellular responses and therapeutic implications. *Curr Pharm Des.* 2011; 17(35): 3905–3932. doi: 10.2174/138161211798357719
12. Curran R. D., Ferrari F. K., Kispert P. H., Stadler J., Stuehr D. J., Simmons R. L., Billiar T. R. Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J.* 2001. 5(7): 2085–2092. doi: 10.1096/fasebj.5.7.1707021
13. Dynnik V.V., Grishina E.V., Fedotcheva N.I. The mitochondrial NO-synthase/guanylate cyclase/protein kinase G signaling system underpins the dual effects of nitric oxide on mitochondrial respiration and opening of the permeability transition pore. *FEBS J.* 2020; V. 287(8): 1525–1536. doi: 10.1111/febs.15090.
14. Ellacott K., Morton G. J., Woods S. C., Tso P., Schwartz M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab.* 2010; 12(1): 10–17. doi: 10.1016/j.cmet.2010.06.001
15. Feng Ch., Chen L., Li W., Elmore B.O., Fan W., Sun X. Dissecting regulation mechanism of the FMN to heme interdomain electron transfer in nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*. 2014; 130: 130–40. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.09.005
16. Fernandes-Lima F., Monte T. L. Nascimento F. A., Gregório B. M. Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First Hit of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Cells Tissues Organs*. 2016; 201(6): 464–472. doi: 10.1159/000446514
17. Ford P.C., Miranda K.M. The solution chemistry of nitric oxide and other reactive nitrogen species. *Nitric Oxide.* 2020; 103: 31–46. doi: 10.1016/j.niox.2020.07.004
18. Ganzarolli de Oliveira M. S-Nitrosothiols as Platforms for Topical Nitric Oxide Delivery. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016; 119(30): 49–56. doi: 10.1111/bcpt.12588
19. Keszler A., Diers A.R., Ding Z., Hogg N. Thiolate-based dinitrosyl iron complexes: Decomposition and detection and differentiation from S-nitrosothiols. *Nitric Oxide.* 2017; 65: 1–9. doi: 10.1016/j.niox.2017.01.007
20. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Lylyk I.S. Indexes of citrulline metabolism in rat liver under the toxic injury against the background of alimentary protein deficiency. *Ukr. Biochem. J.* 2020; 92(1): 113–119. doi: 10.15407/ubj92.01.113
21. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Zhuretska O.M. Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr. Biochem. J.* 2017; 89(2): 92–98. doi: 10.15407/ubj89.02.092
22. Maniam J., Antoniadis C.P., Morris M.J. The effect of early-life stress and chronic high-sucrose diet on metabolic outcomes in female rats. *Stress.* 2015; 18(5): 524–37. doi: 10.3109/10253890.2015.1079617
23. Möller M.N., Rios N., Trujillo M., Radi R., Denicola A., Alvarez B. Detection and quantification of nitric oxide-derived oxidants in biological systems. *J Biol Chem.* 2019; 294(40): 14776–14802. doi: 10.1074/jbc.REV119.006136
24. Qingdong K., Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1. *Mol Pharmacol.* 2006; 70(5): 1469–1480. doi: 10.1124/mol.106.027029
25. Radi R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115(23): 5839–5848. doi: 10.1073/pnas.1804932115
26. Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123(11): 1939–1951. doi: 10.1093/jn/123.11.1939
27. Speckmann B., Steinbrenner H., Grune T., Klotz L.O. Peroxynitrite: From interception to signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2016; 595: 153–160. doi: 10.1016/j.abb.2015.06.022
28. Stomberski C.T., Hess D.T., Stamler J.S. Protein S-Nitrosylation: Determinants of Specificity and Enzymatic Regulation of S-Nitrosothiol-Based Signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2019; 30(10): 1331–1351. doi: 10.1089/ars.2017.7403
29. Van Sundert K., Radujković D., Cools N., De Vos B., Etzold S., Fernández-Martínez M., Janssens I.A., Merilä P., Peñuelas J., Sardans J., Stendahl J., Terrer C., Vicca S. Towards comparable assessment of the soil nutrient status across scales-Review and development of nutrient metrics. *Glob Chang Biol.* 2020; 26(2): 392–409. doi: 10.1111/gcb.14802.
30. Zhang Y., Hogg N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38(7): 831–832. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.12.016

THE CONTENT OF NITRIC OXIDE AND S-NITROSOTHIOLS IN RATS' LIVER CELLS UNDER THE DIFFERENT SUPPLEMENTATION OF MACRONUTRIENT

H. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, O. M. Kuziak

This paper presents studies of nitric oxide and low-molecular S-nitrosothiols in the mitochondrial and cytosolic fractions of the rats' liver under the conditions of, alimentary protein deprivation, consumption of excess sucrose content and combined action of two adverse factors. In order to model the low-protein diet of the animal for 28 days received an isocaloric diet containing 4.7% protein, 10% fat, 81,3% carbohydrates (starch – 37%, sucrose – 30%, cellulose – 5%) and was calculated in accordance with the recommendations of the American Institute of Nutrition. The high-sugar diet consisted of 14% protein, 10% fat, 72% carbohydrates (starch – 37%, sucrose – 30%, cellulose – 5%). The mitochondrial and cytosolic fraction of rat liver cells were obtained by the method of differential centrifugation. Nitrogen oxide content was assessed by a unified method by determining the NO_2^- content, which is a stable metabolite of nitric oxide. Since NO is inactivated into an oxidase reaction with the conversion into nitrite or nitrate that is quickly metabolized, the nitrogen oxide content was assessed by the change in NO_2^-. The concentration of S-nitrosothiols was recorded, respectively, by determining the concentration of nitrite anion before and after the addition of Hg^{2+} ions, which by modifying the S – N bonds catalyzes the release of S-nitrosyl thiols of nitric oxide. An increase in NO content in both hepatic subcellular fractions of the rats' experimental groups compared to control values was found. However, a lack of protein in the diet (protein deficiency in the diet leads to an increase in nitric oxide levels in 3-4 times) can be considered as a key factor in the recorded changes in the mitochondria of the animals' liver, while in the cytosol - excessive consumption of sucrose (3-5 times increase). Regarding the level of S-nitrosothiols, in the studied fractions, multidirectional changes in their concentration were found. Thus, an increase in the content of nitrosyl derivatives in the mitochondria of rat's liver cells with a simultaneous decrease in their level in the cytosol indicates dysmetabolic disorders in the transport system and deposition of nitric oxide, which can lead to the development of nitrosative stress under the experimental conditions.

Keywords: nitric oxide, s-nitrosothiols, nitrosative stress, alimentary protein deprivation, high-sugar diet

Отримано редколегією 28.08.2020 р.