

УДК [577.152.1:546.172.6] + 616.36-002

ВМІСТ ОКСИДУ АЗОТУ В ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ ЗА УМОВ АЛІМЕНТАРНОЇ ДЕПРИВАЦІЇ ПРОТЕЇНУ ТА ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ

Г. П. КОПИЛЬЧУК, І. М. НИКОЛАЙЧУК, Ю. І. КОХАНЮК

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

У роботі представлені дослідження вмісту оксиду азоту в субклітинних фракціях печінки та сироватці крові щурів за умов аліментарної депривації протеїну і гострого токсичного ураження ацетамінофеном. З метою моделювання низькопротеїнової дієти тварини протягом 28 днів отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7 % протеїну, 10 % жирів та 85,3 % вуглеводів, розрахований згідно з рекомендаціями American Institute of Nutrition. Моделювання гострого токсичного ураження проводили шляхом введення *per os* дослідним тваринам ацетамінофену з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини. Мітохондріальну та цитозольну фракцію клітин печінки щурів отримували методом препаративного диференційного центрифугування. Вміст оксиду азоту визначали за 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^- . Встановлено, що в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки щурів відбувається підвищення вмісту оксиду азоту порівняно з контролем з максимальними значеннями в групі тварин, яким на тлі аліментарної депривації протеїну вводили токсичні дози ацетамінофену (на 60 % та 42 % відповідно). Водночас у сироватці крові дослідних груп щурів також спостерігається підвищення вмісту NO порівняно зі значеннями контрольної групи тварин. Слід відмітити, що аліментарна депривація протеїну та введення токсичних доз ацетамінофену проявляють однаковий характер щодо змін концентрації оксиду азоту. Таким чином реалізація біологічних ефектів оксиду азоту, в значній мірі, визначається його біодоступністю, тобто рівновагою між його генеруванням, з одного боку, та утилізацією в тканинах або перехопленням супероксидними аніон-радикалами й взаємодією з іншими клітинними компонентами, з іншого. Зростання вмісту NO може викликати порушення в редокс-залежних механізмах, які є проміжним етапом у виникненні та розвитку патологічних станів.

Ключові слова: оксид азоту, NO -синтаза, аліментарна депривація протеїну, ацетамінофен, токсичне ураження, печінка

Вступ. Оксид азоту (NO) – один із біорегуляторів системної дії, задіяний у численних біохімічних процесах. Здатність швидко дифундувати й вільно проникати в клітини та екстрацелюлярний простір завдяки ліпофільності відображає різноманітність біологічних ефектів NO (Erkens et al., 2017; Napolì et al., 2013). Спектр біологічної дії оксиду азоту в значній мірі залежить від його вмісту в клітинах. Прямі ефекти NO спостерігаються при низьких концентраціях, основним призначенням яких є підтримання гомеостазу ендотеліальної та нейрональної функцій організму (Brown, 2010).

Синтез оксиду азоту в організмі відбувається за участю ізоензимів NO -синтази (КФ 1.14.13.39, NOS) з *L*-аргініну. На відміну від конститутивної NOS, яка експресується постійно, активація індукційної ізоформи ензиму відбувається

лише за умов патологічних станів і може бути індукована в клітинах різних типів за дії запальних стимулів (Li et al., 2014).

У низці робіт (Dai et al., 2013; Дмитренко, Холиан, 2007) продемонстровано, що ключовий шлях метаболізму NO – реакція з гемопроїнами. Внутрішньоклітинний ефект оксиду азоту зумовлений його швидким зв'язуванням із геміною простетичною групою гуанілатциклази. NO стимулює розчинну гуанілатциклазу, що призводить до збільшення cGMP – вторинного посередника та потужного регулятора метаболічних процесів. Нещодавно з'ясувалося, що сигнальна система NO – розчинна гуанілатциклаза – cGMP задіяна не лише в системі гемостазу, а бере участь у регуляції проліферативних процесів у клітинах (Förstermann, Sessa, 2012).

Гіперпродукція NO в гепатоцитах призводить до зниження активності каталази та цитохрому P-450 внаслідок зворотної дисоціації гему від апоферменту. NO також реагує з оксигемоглобіном еритроцитів, утворюючи метгемоглобін, внаслідок чого порушується транспорт кисню в крові (Bian, 2012). Унаслідок цього NO перетворюється в іон нітриту (NO_2^-), а за наявності гемового Fe^{2+} NO_2^- – у більш стабільний іон нітрату (NO_3^-). У клітинах кліренс NO може відбуватися також шляхом його спонтанного окислення киснем до NO_2^- і NO_3^- (Gisone et al., 2004). Нітрати, безсумнівно, є основним кінцевим продуктом окислення NO і рівень цього метаболіту в крові та тканинах перевищує вміст нітриту принаймні на два порядки (mM NO_3^- проти nM NO_2^-).

Окрім цього, збільшення вмісту NO супроводжується утворенням високореакційного пероксинітриту (ONOO^-). ONOO^- виступає потужним прооксидантом та цитотоксином: посилює деструкцію клітинних структур шляхом модифікації протеїнів за залишками тирозину, індукує процеси пероксидного окислення ліпідів, призводячи до поглиблення оксидативно-нітрозативного стресу (Chen et al., 2017; Radi, 2013).

Зростання кількості досліджень в області біологічної дії оксиду азоту характеризується виявленням множинності його ефектів, які демонструють як токсичну, так і захисну роль цієї «універсальної» молекули. При цьому питання особливостей змін вмісту NO у клітинах печінки за умов гострого токсичного ураження та аліментарної депривації протеїну залишається відкритим.

З огляду на вищезазначене метою роботи було дослідити вміст оксиду азоту в субклітинних фракціях печінки та сироватці крові щурів за умов ацетамінофен-індукованого ураження та аліментарної нестачі протеїну.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на білих безпородних щурах віком 2,5-3 місяці та масою 120-150 г. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes» (Strasbourg, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Нормування добового раціону проводили з урахуванням принципу парного харчування (Lomba et al., 2010). Протягом експерименту проводили моніторинг стану тварин. Щоденно

фіксували масу тіла тварин та кількість спожитої їжі.

Моделювання гострого токсичного ураження проводили шляхом введення *per os* дослідним тваринам ацетамінофену з розрахунку 1250 мг/кг маси тварини у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю 1 раз в день протягом 2 діб (Стефанов, 2001; Покотило, Коваль, 2009).

Модель дослідження передбачала поділ тварин на групи:

I – тварини, які утримувалися на збалансованому напівсинтетичному раціоні – група контролю (К) (Reeves et al., 1993);

II – тварини, які протягом 28 днів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон (1/3 загально-прийнятої норми добової потреби протеїну) (НПР) (Korylchuk et al., 2017);

III – тварини, яким після перебування на збалансованому раціоні, моделювали токсичне ураження ацетамінофеном (ТУ);

IV – тварини, яким на тлі аліментарної депривації протеїну індукували гостре токсичне ураження ацетамінофеном (НПР+ТУ).

Тварини I та III групи отримували раціон, збалансований за всіма нутрієнтами, що містив 14 % протеїну (у вигляді казеїну), 10 % жирів, 76 % вуглеводів. Тварини II та IV групи отримували ізоенергетичний раціон, що містив 4,7 % протеїну, 10 % жирів та 85,3 % вуглеводів, розрахований згідно з рекомендаціями *American Institute of Nutrition* (Reeves et al., 1993).

Цервікальну дислокацію дослідних тварин під легким ефірним наркозом проводили на 28 та 31 доби експерименту.

Мітохондріальну фракцію клітин печінки отримували методом диференційного препаративного центрифугування (Акопова, Сагач, 2004). До середовища гомогенізації входили: 250 мМ розчин сахарози, 1 мМ EDTA, 10 мМ трис- HCl , pH 7,4. Отриманий тканинний гомогенат фільтрували через чотири шари марлі. Ядра та уламки клітин осаджували центрифугуванням при 800 g протягом 10 хв. Фракцію мітохондрій із супернатанту осаджували при 10000 g впродовж 10 хв. Отриманий осад двічі промивали середовищем виділення субклітинної фракції без EDTA.

Мікосомну фракцію отримували методом (Sabatini, 2014). Надосадову рідину, що залишалася після отримання мікосомної фракції, відбирали та використовували у подальших дослідженнях як цитозольну (постмікосомну) фракцію.

Для отримання сироватки крові цільну кров вносили в попередньо прогріті пробірки та

залишали при температурі 37°C протягом 30 хв для утворення фібринового згустку. Тонкою скляною паличкою відділяли згусток від стінок пробірки з подальшим центрифугуванням при 1000 g впродовж 20 хв. Сироватку крові обережно відбирали та використовували в подальших дослідженнях.

Вміст оксиду азоту визначали за уніфікованим методом (Hwang et al., 1994) 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^- (Curgan et al., 2001). Для цього до інкубаційної суміші додавали розчин 2 M HClO_4 та центрифугували при 1000 g протягом 15 хв. Вміст NO_2^- в досліджуваних субклітинних фракціях та сироватці крові реєстрували за інтенсивністю забарвлення фіолетово-червоного азокомплексу при $\lambda = 548$ нм. Побудову калібрувальної кривої для визначення кількості NO_2^- здійснювали з використанням стандартного розчину NaNO_2 в

20 mM калій-фосфатному буфері (pH 7,4) з наступною серією розведень різної концентрації при додаванні реактиву Гріса.

Концентрацію протеїну в дослідних зразках визначали за методом Лоурі (Lowry 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 показках вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $P < 0,05$).

Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що в мітохондріальній фракції всіх дослідних груп тварин спостерігається підвищення вмісту оксиду азоту (рис. 1). Максимальне зростання рівня даного показника (на 60 %) порівняно з контролем зареєстровано в щурів, яким після перебування на низькопротеїновій дієті моделювати гостре токсичне ураження (рис. 1).

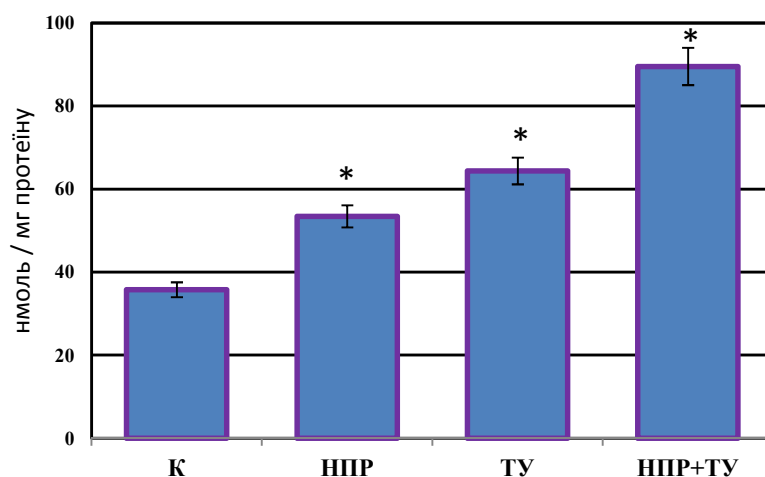


Рис. 1. Вміст оксиду азоту в мітохондріальній фракції клітин печінки щурів за умов токсичного ураження та аліментарної депривації протеїну

Примітка (тут і надалі):

К – тварини, які утримувалися на збалансованому напівсинтетичному раціоні (контроль);

НПР – тварини, які протягом 28 днів до початку експерименту отримували напівсинтетичний низькопротеїновий раціон;

ТУ – тварини, яким після перебування на збалансованому раціоні, моделювали токсичне ураження ацетамінофеном;

НПР+ТУ – тварини, яким на тлі аліментарної депривації протеїну індукували гостре токсичне ураження ацетамінофеном;

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

Fig. 1. Nitric oxide content in the rat liver mitochondrial fraction under conditions of alimentary protein deprivation and toxic injury

Note (here and farther):

C – rats maintained on full-value semi-synthetic ration – control group;

LPR – rats maintained on low-protein ration;

H – animals subjected to acetaminophen-induced liver lesions receiving complete ration;

LPR+H – animals subjected to acetaminophen-induced liver lesions that were previously fed semi-synthetic low-protein ration;

* – significant difference comparing to control, $P \leq 0,05$.

Відомо, що оксид азоту, який утворюється за участю мітохондріальної NO-синтази, є ендogenousним регулятором енергетики мітохондрій – мембранного потенціалу, дихання та синтезу АТР (Feng et al., 2014). Під дією цитотоксичних дериватів NO внаслідок окислення або нітрозилування тіолових груп цистеїновмісних ділянок білків внутрішньої мембрани мітохондрій (АТР/АDP-антипортери), може відбуватися відкриття мітохондріальних пор, експресія та вихід у цитозоль проапоптичних білків, що підтверджується попередніми дослідженнями (Voloshchuk, Korylchuk, 2015). Саме таке неспецифічне відкриття пор перетворює мітохондрії з «електростанцій» у «топку» субстратів окислення без утворення АТР.

За даними літератури (Li et al., 2014; Dai et al., 2013), в гепатоцитах значні кількості NO утворюються за дії індукцибельної NO-синтази. Такі зміни супроводжується порушенням метаболічних процесів у печінці, які найчастіше корелюють з активністю амінотрансфераз у плазмі (Voloshchuk et al., 2014). Так, ефекти NO, опосередковані дією NOS, проявляються в інгібуванні глікогеногенезу, глікогенолізу та основних етапів гліколізу, які відбуваються в цитозолі клітин, шляхом нітрозилування і нітрозилування ключових ензимів зазначених метаболічних шляхів.

Аналіз отриманих результатів засвідчує, що в цитозольній фракції клітин печінки усіх дослідних груп щурів спостерігається зростання вмісту оксиду азоту (рис. 2). Так, у тварин, які

споживали обмежену кількість харчового протеїну, вміст NO в 1,3 рази перевищував значення контролю (рис. 2). Відомо, що L-аргінін – єдиний субстрат для синтезу NO всіма формами NOS. Доступність внутрішньоклітинного L-аргініну є лімітуючим фактором синтезу оксиду азоту та потенційним механізмом контролю регуляторної функції NO, оскільки більшість типів клітин не здатні синтезувати L-аргінін і потребують його екзогенного надходження (Van Faassen et al., 2009). Враховуючи те, що за дії певних факторів та умов середовища, організму притаманні зміни інтенсивності синтезу NO, зростання вмісту оксиду азоту в даному випадку, ймовірно, можна розглядати як дію багатофункціональної ефекторної молекули, що здійснює міжклітинну комунікацію та сприяє адаптації різних систем організму.

Водночас за умов моделювання токсичного ураження тваринам, які перебували на повноцінному напівсинтетичному раціоні та зазнавали аліментарної нестачі протеїну, в цитозольній фракції клітин печінки спостерігається підвищення вмісту NO в 1,5 та 1,7 рази відповідно порівняно з показниками контролю (рис. 2). Ймовірно, за умов введення токсичних доз ацетамінофену посилене утворення оксиду азоту відбувається внаслідок активації індукцибельної NO-синтази.

З іншого боку, необхідно врахувати, що інтермедіати тіол-дисульфідної системи можуть виступати транспортерами NO, тим самим підвищуючи його біодоступність.

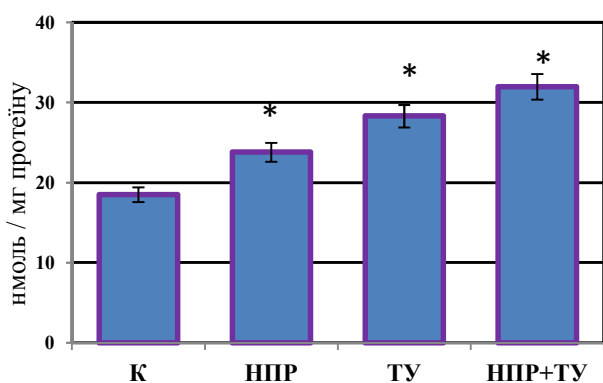


Рис. 2. Вміст оксиду азоту в цитозольній фракції клітин печінки щурів за умов токсичного ураження та аліментарної депривації протеїну
Fig. 2. Nitric oxide content in the rat liver cytosolic fraction under conditions of alimentary protein deprivation and toxic injury

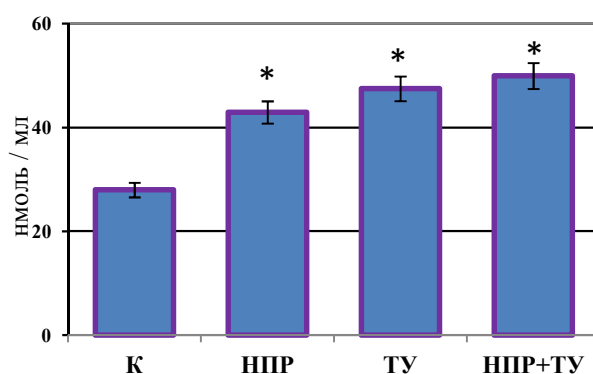


Рис. 3. Вміст оксиду азоту в сироватці крові щурів за умов токсичного ураження та аліментарної депривації протеїну
Fig. 3. Nitric oxide content in the blood serum of rats under conditions of alimentary protein deprivation and toxic injury

Оскільки попередніми дослідженнями (Korylchuk et al., 2016) показано, що за даних експериментальних умов відбувається зниження концентрації більшості тіолів – глутатіону, цистеїну, які здатні обмежувати цитотоксичність NO та його дериватів, шанс клітин вижити за умов патологічного процесу потенційно знижується.

Відсутність електричного заряду та невеликі розміри молекули NO дозволяють їй легко проникати через мембрани клітин та здійснювати прямий цитотоксичний і цитопатичний вплив (Dai et al., 2013). Так, у сироватці крові дослідних груп щурів спостерігається підвищення вмісту NO порівняно з контролем (рис. 3). Як видно з рисунку, аліментарна деривація протеїну та введення токсичних доз ацетамінофену проявляють однаковий характер щодо змін концентрації даного показника.

Висновки. Зростання вмісту оксиду азоту в мітохондріальній та цитозольній фракціях клітин печінки щурів супроводжується підвищенням рівня даного показника в сироватці крові з максимальними значеннями за умов ацетамінофен-індукованого ураження на тлі аліментарної нестачі протеїну. Отже, реалізація біологічних ефектів оксиду азоту, в значній мірі, ви-значається його біодоступністю, тобто рівновагою між його генеруванням, з одного боку, та утилізацією в тканинах або перехопленням супероксидними аніон-радикалами й взаємодією з іншими клітинними компонентами, з іншого. Зростання вмісту NO може викликати порушення в редокс-залежних механізмах, які є проміжним етапом у виникненні та розвитку патологічних станів.

Список літератури

1. Акопова О.В., Сагач В.Ф. Открытие митохондриальной поры под действием Ca^{2+} в миокарде крыс // Укр. біохім. журн. – 2004. – 76 (1). – С. 48–55.
2. Волощук О.Н., Копильчук Г.П., Бучковская И.М. Активность маркерных ферментов печени при токсическом гепатите в условиях алиментарной депривации протеина // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2014. – Т. 108, № 8. – С. 96–100.
3. Дмитренко Н.П., Холиан А. Роль взаимодействия путей метаболизма формальдегида и оксида азота в механизме их токсического действия. 3. основные участки обмена формальдегида и оксида азота, опосредующие их эффекты // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79(5). – С. 72–90.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / Під ред. О.В. Стефанова. – Київ: Авіцена, 2001. – 528 с.
5. Копильчук Г.П., Николайчук И.М., Островська Ю.К. Особливості десульфуразного шляху

- метаболізму сульфуровмісних амінокислот в гепатоцитах щурів в умовах протеїнової недостатності та токсичного ураження // Ukr. Biochem. J. – 2016. – 88(4). – P. 68.
6. Bian K., Ghassemi F., Sotolongo A., Siu A., Shauger L., Kots A., Murad F. NOS-2 signaling and cancer therapy // IUBMB Life. – 2012. – 64(8). – P. 676–683. doi: 10.1002/iub.1057
 7. Brown G.C. Nitric oxide and neuronal death // Nitric Oxide. – 2010. – 23(3). – P.153-165. doi: 10.1016/j.niox.2010.06.001
 8. Chen J.Y., Ye Z.X., Wang X.F., Chang J., Yang M.W., Zhong H.H., Hong F.F., Yang S.L. Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis // Biomed Pharmacother. – 2017. – 97. – P.423–428. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.122
 9. 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). – P. 2085–2092.
 10. Dai Z., Wu Z., Yang Y., Wang J., Satterfield M.C., Meininger C.J., Bazer F.W., Wu G. Nitric oxide and energy metabolism in mammals // BioFactors. – 2013. – 39(4). – P. 383–391. doi: 10.1002/biof.1099
 11. Erkens R., Suvorava T., Kramer C.M., Diederich L.D., Kelm M., Cortese-Krott M.M. Modulation of local and systemic heterocellular communication by mechanical forces: A role of endothelial nitric oxide synthase // Antioxid Redox Signal. – 2017. – 26(16). – P. 917–935. doi: 10.1089/ars.2016.6904
 12. Feng C., 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. – Vol. 130. – P.130–140. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.09.005
 13. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // Eur Heart J. – 2012. – 33(7). – P. 829–837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
 14. Gisone P., Dubner D., Del Pérez Rosario M., Michelin S., Puntarulo S. The Role of Nitric Oxide in the Radiation-induced Effects in the Developing Brain // In vivo. – 2004. – 18(3). – P. 281–292.
 15. Hwang S.M., Lopez C.A., Heck D.E., Gardner C.R., Laskin D.L., Laskin J.D., Denhardt D.T. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial // J Biol. Chem. – 1994. – 269(1). – P. 711–715.
 16. Korylchuk 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). – P. 92–98. doi: 10.15407/ubj89.02.092
 17. Li H., Jamal J., Plaza C., Pineda S.H., Chreifi G., Jing Q., Cinelli M.A., Silverman R.B., Poulos T.L. Structures of human constitutive nitric oxide synthases // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 2014. – 70 (Pt 10). – P. 2667–2674. doi: 10.1107/S1399004714017064
 18. Lomba A., Martínez J.A., García-Díaz D.F., Paternain L., Marti A., Campión J., Milagro F.I. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: A

- nutriepigenetic study on FASN and NDUF6 gene promoters // *Mol Genet Metab.* – 2010. – 101(2–3). – P. 273–278. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.07.017
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem.* – 1951. – 193(1). – P. 265–275.
 20. Napoli C., Paolisso G., Casamassimi A., Al-Omran M., Barbieri M., Sommese L., Infante T., Ignarro L. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights // *J Am Coll Cardiol.* – 2013. – 62(2). – P. 89–95. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.070
 21. Pokotylo O.S., Nedoshytko J.Y. Lipid profile of liver of white rats of both sexes during intoxication by xenobiotics and its correction // *Bioloheia tvaryn.* – 2010. – 12(2). – P. 248–252.
 22. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J Biol Chem.* – 2013. – 288(37). – P. 26464–26472. doi: 10.1074/jbc.R113.472936.
 23. 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 // *J Nutr.* – 1993. – 123(11). – P. 1939–1951.
 24. Sabatini D.D. Preparation of rough microsomes from rat liver // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2014. – 2014(8). – P. 845–851. doi: 10.1101/pdb.prot079970
 25. Van Faassen E.E., Bahrami S., Feelisch M., Hogg N., Kelm M., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V., Li H., Lundberg J.O., Mason R., Nohl H., Rassaf T., Samouilov A., Slama-Schwok A., Shiva S., Vanin A.F., Weitzberg E., Zweier J., Gladwin M.T. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology // *Med. Res. Rev.* – 2009. – 29(5). – P. 683–741. doi: 10.1002/med.20151
 26. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. The Peculiarities of the Structural and Functional State of the Cytochrome Component of the Liver Mitochondrial Respiratory Chain under Conditions of Acetaminophen-Induced Hepatitis on the Background of Alimentary Protein Deprivation // *Biophysics.* – 2015. – 60(3). – P. 420–424. doi: 10.1134/S0006350915030215
- References:**
1. Akopova O.V., Sagach V.F. Induction of the mitochondrial pore opening as affected by Ca²⁺ in the rat myocardium // *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal.* – 2004. – Vol. 76(1). – P. 48–55. (In Russian).
 2. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P., Buchkovskaia I.M. Activity of the marker liver enzymes under the conditions of toxic hepatitis and alimentary deprivation of protein // *Eksp Klin Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 8. – P. 96–100. (In Russian).
 3. Dmitrenko N.P., Holian A. Role of interaction of metabolism pathways of formaldehyde and nitric oxide in the mechanism of their toxic effect. 3. Main metabolism sites of formaldehyde and nitric oxide mediating their effect // *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal.* – 2007. – Vol. 79(5). – P. 72–90. (In Russian).
 4. Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv (metodychni rekomendatsii) / Edited by O. V. Stefanova. – Kyiv: Avitsena, 2001. – 528 p. (In Ukrainian).
 5. Kopylchuk H.P., Nykolaichuk I.M., Ostrovska Y.K. Osoblyvosti desulfuraznoho shliakhu metabolizmu sulfurovmisnykh aminokyslot v hepatotsytakh shchuriv v umovakh proteinovoi nedostatnosti ta toksychnoho urazhennia // *Ukr. Biochem. J.* – 2016. – Vol. 88(4). – P. 68. (In Ukrainian).
 6. Bian K., Ghassemi F., Sotolongo A., Siu A., Shauger L., Kots A., Murad F. NOS-2 signaling and cancer therapy // *IUBMB Life.* – 2012. – 64(8). – P. 676–683. doi: 10.1002/iub.1057
 7. Brown G.C. Nitric oxide and neuronal death // *Nitric Oxide.* – 2010. – 23(3). – P.153–165. doi: 10.1016/j.niox.2010.06.001
 8. Chen J.Y., Ye Z.X., Wang X.F., Chang J., Yang M.W., Zhong H.H., Hong F.F., Yang S.L. Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – 97. – P.423–428. doi: 10.1016/j.biopha.2017.10.122
 9. 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). – P. 2085–2092.
 10. Dai Z., Wu Z., Yang Y., Wang J., Satterfield M.C., Meininger C.J., Bazer F.W., Wu G. Nitric oxide and energy metabolism in mammals // *BioFactors.* – 2013. – 39(4). – P. 383–391. doi: 10.1002/biof.1099
 11. Erkens R., Suvorava T., Kramer C.M., Diederich L.D., Kelm M., Cortese-Krott M.M. Modulation of local and systemic heterocellular communication by mechanical forces: A role of endothelial nitric oxide synthase // *Antioxid Redox Signal.* – 2017. – 26(16). – P. 917–935. doi: 10.1089/ars.2016.6904
 12. Feng C., 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. – Vol. 130. – P.130–140. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2013.09.005
 13. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function // *Eur Heart J.* – 2012. – 33(7). – P. 829–837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
 14. Gisone P., Dubner D., Del Pérez Rosario M., Michelin S., Puntarulo S. The Role of Nitric Oxide in the Radiation-induced Effects in the Developing Brain // *In vivo.* – 2004. – 18(3). – P. 281–292.
 15. Hwang S.M., Lopez C.A., Heck D.E., Gardner C.R., Laskin D.L., Laskin J.D., Denhardt D.T. Osteopontin inhibits induction of nitric oxide synthase gene expression by inflammatory mediators in mouse kidney epithelial // *J Biol. Chem.* – 1994. – 269(1). – P. 711–715.
 16. 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). – P. 92–98. doi: 10.15407/ubj89.02.092
 17. Li H., Jamal J., Plaza C., Pineda S.H., Chreifi G., Jing Q., Cinelli M.A., Silverman R.B., Poulos T.L. Structures of human constitutive nitric oxide synthases // *Acta Crystallographica Section D: Biological*

- Crystallography. – 2014. – 70 (Pt 10). – P. 2667–2674. doi: 10.1107/S1399004714017064
18. Lomba A., Martínez J.A., García-Díaz D.F., Paternain L., Martí A., Campión J., Milagro F.I. Weight gain induced by an isocaloric pair-fed high fat diet: A nutriepigenetic study on FASN and NDUFB6 gene promoters // *Mol Genet Metab.* – 2010. – 101(2–3). – P. 273–278. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.07.017
 19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem.* – 1951. – 193(1). – P. 265–275.
 20. Napoli C., Paolisso G., Casamassimi A., Al-Omran M., Barbieri M., Sommese L., Infante T., Ignarro L. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights // *J Am Coll Cardiol.* – 2013. – 62(2). – P. 89–95. doi: 10.1016/j.jacc.2013.03.070
 21. Pokotylo O.S., Nedoshytko J.Y. Lipid profile of liver of white rats of both sexes during intoxication by xenobiotics and its correction // *Biolohtia tvaryn.* – 2010. – 12(2). – P. 248–252.
 22. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant // *J Biol Chem.* – 2013. – 288(37). – P. 26464–26472. doi: 10.1074/jbc.R113.472936.
 23. 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 // *J Nutr.* – 1993. – 123(11). – P. 1939–1951.
 24. Sabatini D.D. Preparation of rough microsomes from rat liver // *Cold Spring Harb Protoc.* – 2014. – 2014(8). – P. 845–851. doi: 10.1101/pdb.prot079970
 25. Van Faassen E.E., Bahrami S., Feelisch M., Hogg N., Kelm M., Kim-Shapiro D.B., Kozlov A.V., Li H., Lundberg J.O., Mason R., Nohl H., Rassaf T., Samouilov A., Slama-Schwok A., Shiva S., Vanin A.F., Weitzberg E., Zweier J., Gladwin M.T. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology // *Med. Res. Rev.* – 2009. – 29(5). – P. 683–741. doi: 10.1002/med.20151
 26. Voloshchuk O.N., Kopylchuk G.P. The Peculiarities of the Structural and Functional State of the Cytochrome Component of the Liver Mitochondrial Respiratory Chain under Conditions of Acetaminophen-Induced Hepatitis on the Background of Alimentary Protein Deprivation // *Biophysics.* – 2015. – 60(3). – P. 420–424. doi: 10.1134/S0006350915030215

NITRIC OXIDE CONTENT IN RATS HEPATOCYTES UNDER CONDITIONS OF ALIMENTARY PROTEIN DEPRIVATION AND TOXIC INJURY

G. P. Kopylchuk, I. M. Nykolaichuk, Y. I. Kokhaniuk

In the research, the nitric oxide content in the rat liver and blood serum subcellular fractions under the conditions of alimentary protein deprivation and acute toxic damage by acetaminophen are presented. In order to simulate the low-protein diet of the animal for 28 days, an isoenergy diet containing 4.7 % protein, 10 % fats and 85.3% carbohydrates was calculated according to American Institute of Nutrition recommendations. The simulation of acute toxic lesions was performed by per os administration into experimental animals of acetaminophen at a rate of 1250 mg / kg of animal weight. Mitochondrial and cytosolic fraction of the liver cells of the rats were prepared by the method of preparative differential centrifugation. The content of nitrogen oxide was determined according to a unified method by determining the content of NO₂⁻, which is a stable nitrogen oxide metabolite. Since NO is inactivated in the oxidation reaction with conversion into nitrite or nitrate, which is rapidly metabolised, the nitrogen oxide content is evaluated by changing NO₂⁻. It was established that in mitochondrial and cytosolic fractions of liver cells of the rats there is an increase in the content of nitric oxide in comparison with the control with the maximum values in the animal group, which received toxic doses of acetaminophen (60% and 42 % respectively) against the background of alimentary deprivation of protein. Meanwhile, in the blood serum of experimental groups of rats, there is also an increase in NO content compared to the values of the control group of animals. It should be noted that the alimentary deprivation of the protein and the administration of the toxic doses of acetaminophen exhibit the same pattern as changes in the concentration of nitric oxide. In this way, the implementation of the biological effects of nitric oxide is largely determined by its bioavailability, that is, the equilibrium between its generation, on the one hand, and utilization in tissues or interception by superoxide anion radicals and interaction with other cellular components, on the other. The growth of the content of NO may cause a violation in the redox-dependent mechanisms, which is the intermediate stage in the occurrence and development of pathological conditions.

Key words: nitric oxide, NO-synthase, alimentary deprivation of protein, acetaminophen, toxic injury, liver

Отримано редколегією 15.11.2017