

М. В. ДікалБуковинський державний медичний
університет, Чернівці**ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ
У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ
2,4-ДИНІТРОФЕНОЛУ****Ключові слова:** печінка, окиснювальна модифікація білків, морфологічні особливості, 2,4 – динітрофенол.**Резюме.** У досліджах на 36 білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях встановлені біохімічні та морфологічні особливості окиснювальної модифікації білків у печінці за умов уведення 2,4-динітрофенолу, які характеризувалися активацією процесів окисної модифікації білків за зростанням показника R/V (співвідношення інтенсивності червоного (R) та синього (V) кольорів спектра) у білкових масах цитоплазми гепатоцитів та надмірним утворенням кислих груп білків, що свідчить про глибоке порушення рівноваги про- і антиоксидантної системи печінки.**Вступ**

Доведено, що уведення 2,4-динітрофенолу викликає розвиток гострої тканинної гіпоксії із зростанням продукції активних форм кисню [5]. Надмірне накопичення цих продуктів проявляє негативний вплив з активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) біомембран клітин та окиснювальної модифікації білків (ОМБ) [2,9]. Зазначені зміни сприяють розвитку окиснювального стресу, який проявляється ушкодженням біологічних структур клітин із зміною їх амінокислотних залишків, порушення третинної структури білків, в результаті чого знижується їх функціональна активність [4,6]. Тому, вивчення окиснювальної модифікації білків печінки за умов уведення 2,4-динітрофенолу є актуальним на сьогоднішній день.

Мета дослідження

З'ясувати біохімічні та морфологічні особливості окиснювальної модифікації білків у печінці за умов уведення 2,4-динітрофенолу.

Матеріал і методи

Гостру тканинну гіпоксію моделювали шляхом уведення 0,1% розчину 2,4-динітрофенолу 36 білим нелінійним щурам-самцям масою 0,16-0,20 кг внутрішньоочередно в дозі 3 мг/кг одноразово [1, 4]. Стійкість щурів до гострої гіпоксії оцінювали за часом втрати пози на "висотному плато" гострої гіпобаричної гіпоксії і часом загального перебування тварин від моменту досягнення "висоти" 12000 м до появи другого агонального вдишу (час життя або резервний час), а також за часом відновлення пози з моменту початку спуску. Виділяли 3 групи тварин: високо-, середньо- і низькостійкі [1]. Усі подальші дослідження проводили на середньостійких щурах.

© М. В. Дікал, 2013

Ділянки тканини нирок фіксували впродовж 48 годин у 10%-му розчині нейтрального забуференого формаліну, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї етанолу та парафінову заливку при температурі 58°C. Для оцінки окиснювальної модифікації білків зрізи гістохімічно забарвлювали бромфеноловим синім за Мікель-Кальво [8]. Комп'ютерну спектрометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми ColorPic (Graphic Art Tools, 2004). Спосіб гістохімічного визначення співвідношення між основними та кислими групами білків базується на вимірюванні інтенсивності червоного і синього кольорів спектру при комп'ютерно-спектральному аналізі цифрових зображень мікроскопічних об'єктів і розрахунку коефіцієнта R/V, як співвідношення між інтенсивністю забарвлення в ділянці червоного спектру (R) до інтенсивності забарвлення у ділянці синього спектра (V) [7].

Вміст окисномодифікованих білків у гомогенатах визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням гідразонів характерного спектра поглинання. Про ступінь ОМБ судили по кількості утворених альдегідних та кетонних груп. Альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру визначали при 370 нм, а основного- при 430 нм. Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували на фотоелектроколориметрі КФК-3 при 370 нм та 420 нм проти контролю. Вміст ОМБ при $\lambda=370$ нм виражали в ммоль/г білка, при $\lambda=430$ нм - в одиницях оптичної густини на 1г білка [3].

Всі досліді на тваринах проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Отримані цифрові дані опрацьовували статистично.

Обговорення результатів дослідження

За умов уведення 2,4-динітрофенолу спостерігалася активація процесів окиснення білків печінки під дією активних форм кисню з утворенням альдегідо- чи кето груп, що є однією із адаптаційних систем і стимулює активацію мультикаталітичних протеаз, що вибірково руйнують окиснені протеїни, на що вказує вірогідне зростання ОМБ у дослідній групі тварин (рис. 1). [10].

Дані зміни пояснюються тим, що уведення 2,4-динітрофенолу зумовлювало зниження рівня АТФ за рахунок розщеплення процесів окиснення і фосфорилування, а дефіцит АТФ викликав активацію перекисного окиснення ліпідів та білків, що призвело до порушення енергозалежних процесів печінки. Ушкодження бар'єрів кишечника та печінки на фоні енергодефіциту призводило до транслокації ендотоксину з просвіту кишечника в кров, який зумовлював додаткові реакції ушкодження гепатоцитів. Зазначене підтверджено зростанням окисномодифікованих білків за коефіцієнтом R/B за умов уведення 2,4-динітрофенолу [4,5].

Висновки

Встановлені біохімічні та морфологічні зміни окисної модифікації білків печінки за умов уведення 2,4-динітрофенолу, які характеризувалися надмірним утворенням кислих груп білків, зростанням показника R/B у білкових масах цитоплазми гепатоцитів за відсутності змін у жовчних каналцях, що свідчить про глибоке порушення рівноваги про-й антиоксидантної системи печінки.

Перспективи подальших досліджень

Подальші дослідження полягають у вивченні препаратів корекції негативного впливу 2,4-динітрофенолу на стан окисної модифікації білків.

Література. 1. Березовский В.А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности/ В.А. Березовский.- К.: Наук. Думка, 1978.- 216 с. 2. Е.Е. Дубинина Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е. Дубинина, А.В. Пустыгина // Укр. біохім. журнал. – 2008. – Т.80, №6. – С.5-18. 3. І.Ф. Мешишен Механізм окиснювальної модифікації білків / І.Ф. Мешишен В.П. Польовий // Буковинський медичний вісник. — 2001. — 5, №2. — С. 18—25. 4. Ю.С. Роговий Гістоензимохімічні та гістологічні особливості печінки та нирок при введенні 2,4-динітрофенолу / Ю.С. Роговий, М.В. Дікал, В.В. Белявський, Л.О. Філіпова // Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2012.- Т. 11, №3.- С.32-35. 5. Ю.С. Роговий Окисномодифіковані білки у нирках та печінці при інтоксикації 2,4-динітрофенолом та дії мелатоніну в експерименті/ Ю.С. Роговий, В.В. Белявський, М.В. Дікал // Клінічна анатомія та оперативна хірургія.- 2011.- Т. 10, №3.- С.18-21. 6. Г. А. Рябов, Ю. М. Азизов, И. Н. Пасечник и др. Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у больных в критических состояниях // Вестн. интенсивной терапии. Клиническая патофизиология. 2002. No 4. С. 4–7. 7. Пат. 13712 У Україна, МПК 7: А 61 В 10/00. Спосіб вимірювання окислювальної модифікації білків в структурах плаценти / Шендерюк О.П., Давиденко І.С.; заявник: БДМУ - № u200509673; заявлено 14.10.2005; опубл. 17.04.2006., Бюл. «Пром. власність», №4. 8. Шендерюк О.П.

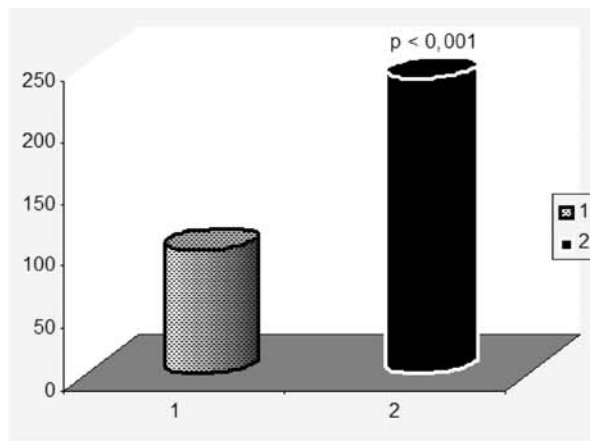


Рис. 1. Окисна модифікація білків у гомогенатах печінки за умов уведення 2,4-динітрофенолу (%). 1 – контроль, 2 - уведення 2,4-динітрофенолу. $p < 0,001$ – достовірність різниці порівняно до контролю. Уведення 2,4-динітрофенолу призводило до посилення окисної модифікації білків за зростанням показника R/B у білкових масах цитоплазми гепатоцитів за відсутності змін у жовчних каналцях (рис. 2, 3)

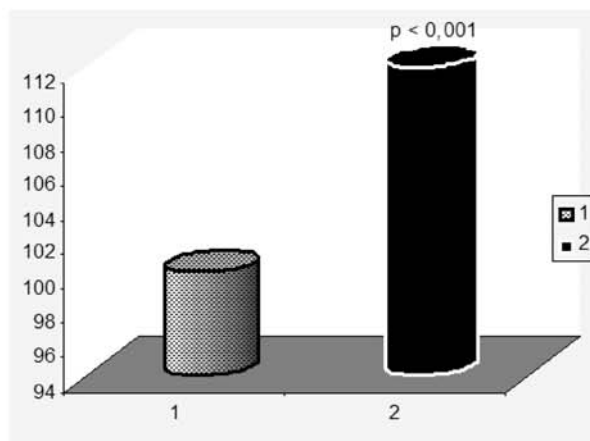


Рис. 2. Окисна модифікація білків у зрізах печінки (білкові маси цитоплазми гепатоцитів) за коефіцієнтом R/B при уведенні 2,4-динітрофенолу (%). 1 – контроль, 2 - уведення 2,4-динітрофенолу. $p < 0,001$ – вірогідність різниці порівняно до контролю

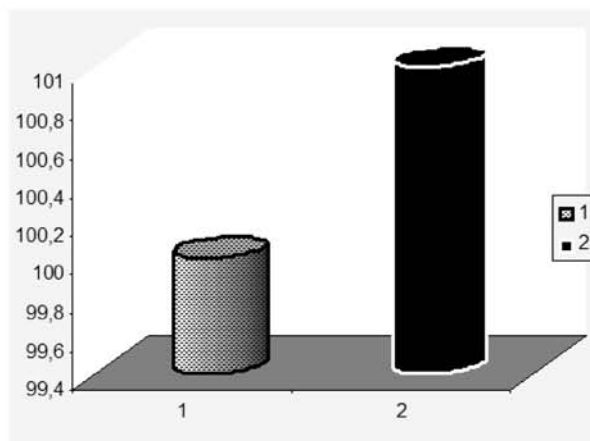


Рис. 3. Окисна модифікація білків у зрізах печінки (цитоплазма епітелію жовчних каналців) за коефіцієнтом R/B при уведенні 2,4-динітрофенолу (%). 1 – контроль, 2 - уведення 2,4-динітрофенолу

.Спосіб вимірювання окислювальної модифікації білків в структурах плаценти / О.П. Шендерюк, І.С. Давиденко // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2006. – Т.5, №2. – С.101. 9. Basic Pathology / [Robbins, Kumar, Abbas, Fausto, Mitchell]. – [8th ed.]. – Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: Elsevier Inc. – 2007. – 902 p. 10. De Supriyo, Ghosh Somiranjan, Chatterjee Raghunath et al. PCB congeners specific oxidative stress by microarray analysis using human liver cell line EHViron. Int. 2010. – 36, № 8. – P.907-917.

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛА

М. В. Дикал

Резюме. В опытах на 36 белых нелинейных половозрелых крысах-самцах установлены биохимические и морфологические особенности окислительной модификации белков печени при условиях введения 2,4-динитрофенола, которые характеризовались активацией процессов окислительной модификации белков по увеличению показателя R/B (соотношение интенсивности красного (R) и синего (B) цвета спектра) в белковых массах цитоплазмы гепатоцитов и избыточным образованием кислых групп белков, что свидетельствует о глубоком нарушении равновесия про-и антиоксидантной системы печени.

Ключевые слова: печень, окислительная модификация белков, морфологические особенности, 2,4 – динитрофенол.

УДК 616.36-008.6:577.112.4:612.014.46] – 092.9

ОКИСНЮВАЛЬНА МОДИФІКАЦІЯ БІЛКІВ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ УВЕДЕННЯ 2,4- ДИНІТРОФЕНОЛУ

М. В. Дікал

Мета. З'ясувати біохімічні та морфологічні особливості окиснювальної модифікації білків у печінці за умов введення 2,4-динітрофенолу.

Матеріал та методи. Гостру тканинну гіпоксію моделювали шляхом введення 0,1% розчину 2,4-динітрофенолу 36 білим нелінійним щурам-самцям масою 0,16-0,20 кг внутрішньоочеревно в дозі 3 мг/кг одноразово. Спосіб гістохімічного визначення співвідношення між основними та кислими групами білків оснований на вимірюванні інтенсивності червоного і синього кольорів спектра при комп'ютерно-спектральному аналізі цифрових зображень мікроскопічних об'єктів і розрахунку коефіцієнта R/B. Вміст окисномодифікованих білків у гомогенатах визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням гідразонів характерного спектру поглинання.

Отримані дані. Встановлені біохімічні та морфологічні особливості окиснювальної модифікації білків у печінці, які ха-

рактеризувалися активацією процесів окисної модифікації білків за зростанням показника R/B у білкових масах цитоплазми гепатоцитів та надмірним утворенням кислих груп білків.

Значення. Доведено, що 2,4-динітрофенол призводить до посилення окисної модифікації білків за зростанням показника R/B у білкових масах цитоплазми гепатоцитів.

Новизна. Уведення 2,4-динітрофенолу призводило до надмірного утворення кислих груп білків, зростання показника R/B у білкових масах цитоплазми гепатоцитів за відсутності змін у жовчних каналцях.

Ключові слова: печінка, окиснювальна модифікація білків, морфологічні особливості, 2,4 – динітрофенол.

OXDATIVE PROTEIN MODIFICATION IN THE RAT LIVER UNDER CONDITIONS OF INTRODUCING 2,4 – DINITROPHENOL

M. V. Dikal

Purpose. To ascertain the biochemical and morphological peculiarities of the oxidative modification of proteins in the liver under the conditions of 2, 4-dinitrophenol introduction.

Materials and Methods. Acute tissue hypoxia was simulated by means of introducing 0,1% solution of 2,4- dinitrophenol to white non-linear female rats with the body weight of 0.16 – 0.20 kg intraperitoneally in a dose of 3 mg/kg in a single dose. A method of histochemical determination of ratio between basic colour with a computer-spectral analyses of the digital images of microscopic objects and coefficient R/B content of oxidative modified proteins in the homogenates was determined according to 2,4- dinitrophenylhydrazine reaction with the formation of hydrozones of the specific spectrum of absorption.

Findings. The biochemical and morphological peculiarities of the oxidative modification of proteins in the liver characterized by an activation and acid groups of proteins based on the measuring intensity of red and dark blue spectrum of the process of oxidative protein modification with an increase of the R/B index in the protein masses of hepatocytes cytoplasm and an excessive formation of acid groups of proteins have been established.

Value. It has been proved that 2,4 - dinitrophenol resulted in excessive formation of oxidative protein groups increase according R/B index in protein cytoplasm masses of hepatocytes.

Novelty. 2,4 – dinitrophenol introducing resulted in excessive formation of acid protein groups, increase of R/B index in protein cytoplasm masses of hepatocytes at the absence of changes in biliary canals.

Bukovyna State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №2 (44). - P.71-73.

Надійшла до редакції 17.05.2013

Рецензент – проф. В. І. Швець

© М. В. Дікал, 2013