

## ОКИСНОМОДИФІКОВАНІ БІЛКИ У НИРКАХ ТА ПЕЧІНЦІ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ 2,4-ДИНІТРОФЕНОЛОМ ТА ДІЇ МЕЛАТОНІНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Ю.Є.Роговий, В.В.Белявський, М.В.Дікал

Кафедра патологічної фізіології (зав. – проф. Ю.Є.Роговий) Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

**Резюме.** У дослідах на 40 білих нелінійних щурах-самцях при гіпонатрієвому раціоні харчування через 2 год моделювання тканинної гіпоксії введенням 2,4-динітрофенолу показано підвищення ступеня окисномодифікованих білків у нирках та печінці щурів за коефіцієнтом R/V. Установлено захисний вплив екзогенного мелатоніну на ступінь окисномодифікованих білків у нирках та печінці щурів, який зменшував рівень коефіцієнта R/V у проксимальних і дистальних відділах нефрону, збірних каналцях сосочка нирок та білкових масах цитоплазми гепатоцитів.

**Ключові слова:** 2,4-динітрофенол, нирка, печінка, мелатонін, окисномодифіковані білки.

Відомо, що введення 2,4-динітрофенолу викликає розвиток гострої тканинної гіпоксії (ГТГ) [1, 2] через розщеплення процесів окиснення і фосфорилювання, що може призвести до розладів функції нирок та супроводжуватися порушенням головного енергозалежного процесу – реабсорбції іонів натрію [3, 4]. Такі зміни на початкових етапах ушкодження можуть супроводжуватися утворенням вільних радикалів й активацією вільнорадикального окиснення біомолекул (білків, ліпідів, нуклеїнових кислот) [5]. Попереджувати розвиток даних реакцій ушкодження може мелатонін, який є донором електронів та синергістом багатьох антиоксидантів, зв'язує вільні радикали, стимулює активність антиокиснювальних ферментів, захищає ядра клітин від пошкодження. Мелатонін є сильним антиоксидантом і забезпечує захист білкових молекул від окиснювального пошкодження, є однією із головних молекул у системі захисту організму від окиснювального стресу і може виявляти протекторні властивості на каналці нирок [6]. Водночас захисна роль мелатоніну на ступінь окисномодифікованих білків у нирках та печінці щурів за умов гіпонатрієвого раціону харчування при ГТГ, зумовленій введенням 2,4-динітрофенолу, досліджена недостатньо.

**Мета дослідження:** з'ясувати захисну роль екзогенного мелатоніну на ступінь окисно-

дифікованих білків у гістологічних зрізах печінки та нирок щурів за умов гіпонатрієвого раціону харчування при ГТГ, зумовленій введенням 2,4-динітрофенолу.

**Матеріал і методи.** Експерименти проведені на 40 самцях білих нелінійних щурів масою 0,16-0,2 кг, в яких моделювали ГТГ шляхом введення 0,1% розчину 2,4-динітрофенолу внутрішньоочеревинно в дозі 3 мг/кг одноразово [7]. 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 вдиху (час життя або резервний час), а також за часом відновлення пози з моменту початку спуску. Виділяли 3 групи тварин: високо-, середньо- і низькостійкі [8]. Усі подальші дослідження проводили на середньостійких щурах. Екзогенний мелатонін вводили в дозі 3,5 мг/кг одноразово [6].

Шматочки печінки та нирок фіксували впродовж 48 год у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну, після чого проводили процедуру зневоднювання у висхідній батареї етанолу та парафінове заливання при температурі 58°C. Для оцінки окиснювальної модифікації білків зрізи гістохімічно забарвлювали бромфеноловим синім за Мікель-Кальво [9].

Комп'ютерну спектрометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми ColorPic (Graphic Art Tools, 2004). Спосіб гістохімічного визначення співвідношення між основними та кислими групами білків оснований на вимірюванні інтенсивності червоного і синього кольорів спектру при комп'ютерно-спектральному аналізі цифрових зображень мікроскопічних об'єктів і розрахунку коефіцієнта R/B – співвідношення між інтенсивністю забарвлення у ділянці червоного спектру (R) до інтенсивності забарвлення у ділянці синього спектру (B) (пат. № 13712 U, 2006). Всі досліді на тваринах проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких вико-

ристовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Статистичне оброблення одержаних даних проводили на комп'ютері за допомогою програми "Statgrafics" та "Excell 7.0".

**Результати дослідження та їх аналіз.** Гістохімічне забарвлення тканин нирок та печінки бромфеноловим синім за Мікель-Кальво призвело до фарбування білків, що містять кислі групи, у червоний колір, а основні групи – у синій колір. Відношення інтенсивності червоного кольору до синього характеризує перевагу кислих білків над основними у тканині і свідчить про ступінь окиснювальної модифікації білків. Якщо величина показника R/B дорівнює "1",

Таблиця

Ступінь окиснювальної модифікації білків за коефіцієнтом R/B (ум. од.) при гістохімічному аналізі зрізів нирок та печінки щурів, отруєних 2,4-динітрофенолом, та при дії мелатоніну ( $X \pm Sx$ )

Структура, де вимірювався показник R/B	Групи дослідження		
	Контроль, інтактні тварини (n=8)	Введення 2,4-динітрофенолу (n=8)	Введення 2,4-динітрофенолу на фоні мелатоніну (n=8)
Цитоплазма епітелію проксимальних каналців	1,08±0,005	1,39±0,009 p<0,001	1,24±0,008 p<0,001
Цитоплазма епітелію мозкових товстих висхідних частин петлі нефрону	1,04±0,004	1,18±0,007 p<0,001	1,05±0,004 p<0,001
Цитоплазма епітелію трубочок сосочка	1,03±0,004	1,15±0,008 p<0,001	1,04±0,005 p<0,001
Білкові маси цитоплазми гепатоцитів	1,12±0,006	1,26±0,009 p<0,001	1,19±0,008 p<0,001
Цитоплазма епітелію жовчних проток	0,94±0,005	0,95±0,006	0,93±0,006

Примітка: p – вірогідність різниць порівняно з контролем, p<sub>1</sub> – вірогідність різниць порівняно із введенням 2,4-динітрофенолу, n – число спостережень.

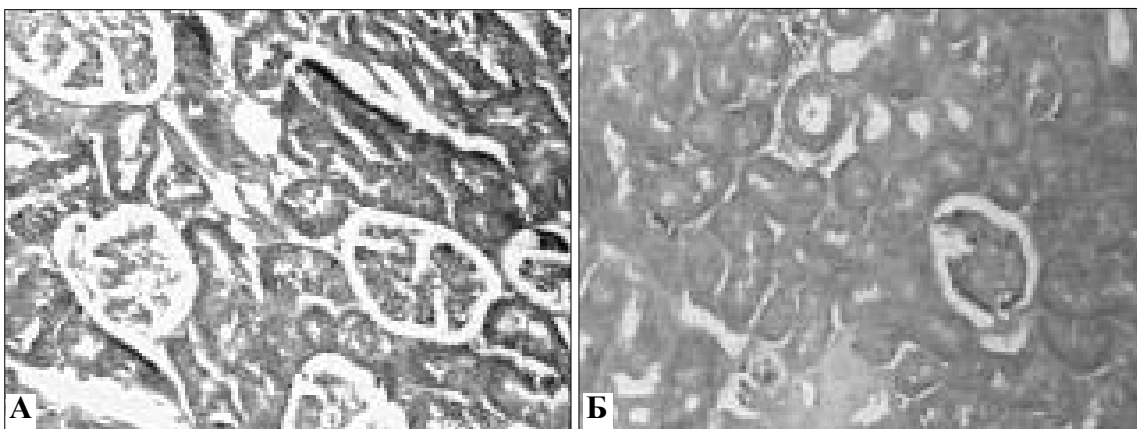


Рис. 1. Кіркова речовина нирки щура при гістохімічному забарвленні білків бромфеноловим синім за Мікель-Кальво в контролі (А) та при токсичному ураженні 2,4-динітрофенолом за умов гіпонатрієвого раціону харчування (Б). Об. 40 $\times$ . ок. 10 $\times$ .

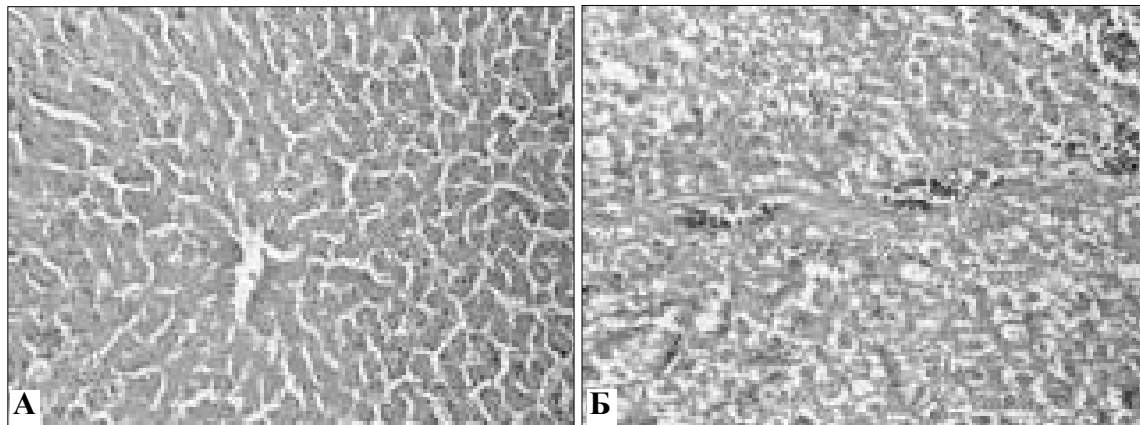


Рис. 2. Білкові маси цитоплазми гепатоцитів щура при гістохімічному забарвленні білків бромфеноловим синім за Мікель-Кальво в контролі (А) та при токсичному ураженні 2,4-динітрофенолом за умов гіпонатрієвого раціону харчування (Б). Об. 40 $\times$ . ок. 10 $\times$ .

співвідношення між основними та кислими білками рівне, якщо величина показника вище "1" – переважають кислі білки (пат. № 13712 У, 2006).

Введення 2,4-динітрофенолу призводило до посилення окисної модифікації білків за зростанням показника R/B у проксимальних канальцях, мозкових товстих висхідних частинах петлі нефрону, збірних канальцях сосочка нирок, у білкових масах цитоплазми гепатоцитів за відсутності змін у жовчних протоках (таблиця; рис. 1, 2). При введенні тваринам мелатоніну виявлено гальмування окисної модифікації білків за зниженням показника R/B у проксимальних канальцях, мозкових товстих висхідних частинах петлі нефрону, збірних канальцях сосочка нирок, у білкових масах цитоплазми гепатоцитів за відсутності змін у жовчних протоках.

Введення 2,4-динітрофенолу призводило до подвійного зниження рівня АТФ у ниркових канальцях [7] за рахунок розщеплення окиснення і фосфорилування. Дефіцит АТФ викликав активацію перекисного окиснення ліпідів та білків, що призводило до порушення головного енергозалежного процесу ниркових канальців – реабсорбції іонів натрію [3]. Ушкодження бар'єрів кишечника та печінки на фоні енергодефіциту призводило до транслокації ендотоксину з просвіту кишечника в кров, який зумовлював додаткові реакції ушкодження ниркових канальців та гепатоцитів. Зазначене підтверджено зростанням окисномодифікованих білків за коефіцієнтом R/B, що можна розцінювати як

прояв ранніх механізмів розвитку псевдогепатorenального синдрому за умов введення 2,4-динітрофенолу [10].

Окиснення білків під дією активних форм кисню з утворенням альдегідо- чи кетогруп [5] є однією з адаптаційних систем і стимулює активацію мультикаталітичних протеаз, що вибірково руйнують окиснені протеїни. При надмірному утворенні активних форм кисню, зокрема при окисдаивному стресі, модифікація білків завершується утворенням кислих груп білків, що свідчить про глибоке порушення рівноваги про- та антиоксидантної системи. Мелатонін за рахунок своїх антиоксидантних властивостей виявляє захисні цитопротекторні впливи на канальці нирок та гепатоцити, що призводить до зниження коефіцієнта R/B у гістологічних зразках печінки та нирок щурів порівняно зі значенням при інтоксикації 2,4-динітрофенолом.

**Висновки.** 1. У досліджах на білих нелінійних статевозрілих щурах-самцях при гіпонатрієвому раціоні харчування через 2 год моделювання тканинної гіпоксії при введенні 2,4-динітрофенолу показано підвищення ступеня окисномодифікованих білків у нирках та печінці щурів за коефіцієнтом R/B. 2. Установлено захисний вплив екзогенного мелатоніну на ступінь окисномодифікованих білків у нирках та печінці щурів, який зменшував рівень коефіцієнта R/B у проксимальних, і дистальних відділах нефрону, збірних канальцях сосочка нирок та білкових масах цитоплазми гепатоцитів.

### Література

1. Агаджанян Н.А. Классификация гипоксических, гипо- и гиперкапнических состояний / Н.А.Агаджанян, А.Я.Чижов // *Фізіол. ж.* – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 11-16.
2. Eckardt K.U. Role of hypoxia in the pathogenesis of

renal disease / K.U.Eckardt, C.Rosenberger, J.S.Jurgensen [et. al.] // *Blood Purif.* – 2003. – № 21. – P. 253-257.

3. Гоженко А.І. "Приховане" ушкодження проксимального відділу нефрону / А.І.Гоженко, Ю.Є.Роговий, О.С.Федорук // *Одеський мед. ж.* – 2001. – № 5. – С. 16-19.

4. Пішак В.П. Універсальність ушкодження проксимального канальця при захворюваннях нирок / В.П.Пішак, В.В.Білокий, Ю.Є.Роговий // *Клін. та експерим. патол.* – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 72-76.

5. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях / Е.Е.Дубинина, А.В.Пустыгина // *Укр. біохім. ж.* – 2008. – Т. 80, № 6. – С. 5-18.

6. Шинкарьок В.Г. Характеристика показників іонорегулювальної функції нирок у щурів у динаміці розвитку гліцеролової гострої ниркової недостатності за різних умов освітлення на фоні екзогенного введення гормону шишкоподібного тіла мелатоніну / В.Г.Шинкарьок // *Клін. та експерим. патол.* – 2010. – Т. 9, № 2. – С. 122-126.

7. Путилина Ф.Е. Влияние гипоксии и 2,4-динитрофенола на лактатдегидрогеназную реакцию в мозгу, печени и почках / Ф.Е.Путилина, Н.Д.Ещенко // *Вопр. мед. химии.* – 1971. – Т. 17, № 2. – С. 161-165.

8. Березовский В.А. Гипоксия и индивидуальные особенности реактивности / В.А.Березовский. – К.: Наук. думка, 1978. – 216 с.

9. Шендерюк О.П. Спосіб вимірювання окиснювальної модифікації білків в структурах плаценти / О.П.Шендерюк, І.С.Давиденко // *Клінічна анатомія та оперативна хірургія.* – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 101.

10. Маммаев С.Н. Гепаторенальный синдром 1-го и 2-го типа: современное состояние проблемы / С.Н.Маммаев, А.М.Каримова // *Рос. ж. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2008. – Т. 18, № 6. – С. 4-14.

#### ОКИСЛИТЕЛЬНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЕЛКИ В ПОЧКАХ И ПЕЧЕНИ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ 2,4-ДИНИТРОФЕНОЛОМ И ДЕЙСТВИИ МЕЛАТОНИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

**Резюме.** В опытах на 40 белых нелинейных крысах-самцах при гипонатриевом рационе питания через 2 часа моделирования тканевой гипоксии путем введения 2,4-динитрофенола показано повышение степени окислительно-модифицированных белков в почках и печени крыс по коэффициенту R/B. Показано защитное влияние экзогенного мелатонина на степень окислительно-модифицированных белков в почках и печени крыс, который уменьшал уровень коэффициента R/B в проксимальных и дистальных отделах нефрона, собирательных канальцах сосочка почек и белковых массах цитоплазмы гепатоцитов.

**Ключевые слова:** 2,4-динитрофенол, почка, печень, мелатонин, окислительно-модифицированные белки.

#### OXIDATIVELY MODIFIED PROTEINS IN THE KIDNEYS AND LIVER WHEN INTOXICATED WITH 2,4-DINITROPHENOL AND THE ACTION OF MELATONIN IN AN EXPERIMENT

**Abstract.** An elevation of the degree of oxidatively modified proteins in the kidneys and liver of rats based on the R/B coefficient has been demonstrated in experiments on 40 albino non-linear male rats being on a hyposodium ration of feeding in 2 hours of simulating tissue hypoxia upon introducing 2,4-dinitrophenol. A protective effect of exogenous melatonin has been established on the degree of oxidatively modified proteins in the kidneys and liver of rats which lowered the level of the R/B coefficient in the proximal, distal portions of the nephron, the collecting tubules of the renal papilla and the protein masses of the cytoplasm of hepatocytes.

**Key words:** 2,4-dinitrophenol, kidney, liver, melatonin, oxidatively modified proteins.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла 03.06.2011 р.

Рецензент – проф. І.С.Давиденко (Чернівці)