

**Біохімія**

УДК 577.121:577.3

**ОКИСНОМОДИФІКОВАНІ БІЛКИ ЗА ГІСТОХІМІЧНИМИ ДАНИМИ  
У НИРКАХ ЩУРІВ ПРИ ІНТОКСИКАЦІЇ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ І ДІЇ  
МЕЛАТОНІНУ ТА НАСТОЯНКИ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ**

**І. Мацьопа, Н. Григор'єва, І. Давиденко, А. Велика**

*Буковинський державний медичний університет  
пл. Театральна, 2, Чернівці 58000, Україна  
e-mail: ihorlop73@mail.ru*

Вивчено вплив мелатоніну та настоянки ехінацеї пурпурової на ступінь окиснювальної модифікації білків (ОМБ) у нирках щурів при інтоксикації тетрахлорметаном за умов експериментального рівнодення. Показано підвищення ступеня ОМБ у нирках щурів за умов інтоксикації тетрахлорметаном. Встановлено, що п'ятиденне введення препаратів сприяло відновленню ОМБ при інтоксикації чотирихлористим карбоном.

*Ключові слова:* мелатонін, настоянка ехінацеї пурпурової, окисномодифіковані білки, нирки.

Відомо [1, 5], що метаболізм тетрахлорметану в організмі призводить до утворення вільних радикалів і активації вільнорадикального окиснення біомолекул (білків, ліпідів, нуклеїнових кислот тощо).

Метою дослідження було вивчити вплив мелатоніну та настоянки ехінацеї пурпурової на ступінь окиснювальної модифікації білків у гістологічних зрізах нирок щурів при ураженні тетрахлорметаном.

Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували за умов віварію зі сталим температурним (+20°C) режимом і освітленням інтенсивністю 1 500 лк в режимі 12 год світла до 12 год темряви (12С:12Т) протягом усього експерименту. Після 7-денного моделювання світлових умов тварин розділяли на групи, яким вводили розчини: фізіологічний, тетрахлорметану, настоянки ехінацеї та мелатоніну у відповідних концентраціях (табл. 1).

Таблиця 1

Умови моделювання експерименту

Групи тварин	Тваринам вводили:
Контроль	Фізіологічний розчин, який містив 0,046% розчин етилового спирту
Ехінацея	Настоянку ехінацеї пурпурової (м. Житомир) у дозі 0,25 мл/кг маси тварини
Мелатонін	Мелатонін (Sigma, США) з розрахунку 3 мг/кг маси тварини
Ехінацея + мелатонін	Розчин мелатоніну та настоянку ехінацеї пурпурової у відповідних дозах з інтервалом у 5 хв
Інтоксикація тетрахлорметаном	Розчин тетрахлорметану у дозі 0,25 мл/100 г маси тварини (дворазово) з інтервалом в один день
Інтоксикація тетрахлорметаном + ехінацея	Настоянку ехінацеї пурпурової після отруєння тетрахлорметаном у відповідних дозах
Інтоксикація тетрахлорметаном + мелатонін	Розчин мелатоніну після отруєння тетрахлорметаном у відповідних дозах
Інтоксикація тетрахлорметаном + ехінацея + мелатонін	Настоянку ехінацеї пурпурової та мелатонін з інтервалом у 5 хв після отруєння тетрахлорметаном у відповідних дозах

Внутрішньошлункове введення розчинів проводили щоденно о 8.00 год. Через 5 днів від початку введення препаратів проводили декапітацію тварин під легким ефірним наркозом.

Ділянки тканини нирок фіксували впродовж 48 год у 10%-ному 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 [6]. Комп'ютерну спектрометрію здійснювали за допомогою комп'ютерної програми ColorPic (Graphic Art Tools, 2004). Спосіб гістохімічного визначення співвідношення між основними та кислими групами білків заснований на вимірюванні інтенсивності червоного і синього кольорів спектру при комп'ютерно-спектральному аналізі цифрових зображень мікроскопічних об'єктів і розрахунку коефіцієнта R/B як співвідношення між інтенсивністю забарвлення у ділянці червоного спектру (R) до інтенсивності забарвлення у ділянці синього спектру (B) [4].

Усі досліді на тваринах проводили з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986). Отримані цифрові дані опрацьовували статистично за допомогою програми «Excel-7» та «Statistica», використовуючи t-критерій вірогідності Стьюдента.

Раніше нами було показано [3] підвищення вмісту продуктів вільнорадикального окиснення білків і ліпідів (окисномодифікованих білків, малонового альдегіду) у пост'ядерному супернатанті нирок щурів, отруєних тетрахлорметаном.

Розчин бромфенолового синього зафарбував білки тканин нирок у червоний колір, що містять кислі групи, а у синій колір - основні групи. Відношення інтенсивності червоного кольору до синього характеризує перевагу кислих білків над основними у тканині нирок і свідчить про ступінь окиснювальної модифікації білків.

Якщо показник R/B дорівнює «1» – співвідношення між основними та кислими білками рівне, якщо показник вище «1» – переважають кислі білки [4].

Значення коефіцієнта R/B ступеня окиснювальної модифікації білків у гістологічних зрізах нирок щурів за умов експериментального рівнодення –  $0,64 \pm 0,077$  – прийняли за контроль (табл. 2).

Таке значення характеризує стан динамічної рівноваги між основними і кислими групами білків у нирках щурів за умов експериментального рівнодення при інтенсивності освітлення 1500 Лк (рис. 1).

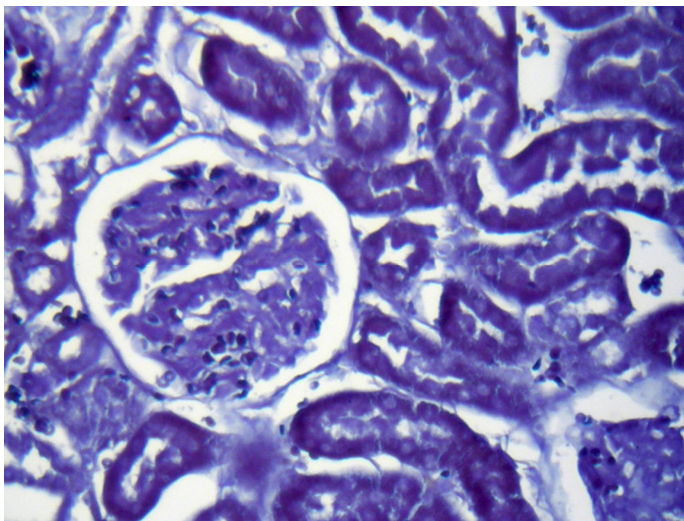


Рис. 1. Кіркова речовина нирки щура за умов експериментального рівнодення при гістохімічному забарвленні білків бромфеноловим синім за Мікель-Кальво (контроль). Об.40 $\times$ . к.10 $\times$ .

Таблиця 2

Ступінь окиснювальної модифікації білків за коефіцієнтом R/B при гістохімічному аналізі зрізів нирок щурів, отруєних тетрахлорметаном, та при дії мелатоніну, настоянки ехінацеї пурпурової, їх сумісному введенні за умов експериментального рівнодення ( $X \pm Sx$ ,  $n=12$  у кожній групі)

Групи тварин	Інтенсивність червоного кольору - R	Інтенсивність синього кольору - B	Коефіцієнт R/B
Контроль	36,5±3,42	57,8±4,51	0,64±0,077
Ехінацеї	38,1±4,20	56,2±6,16	0,68±0,057
Мелатонін	36,9±4,41	46,1±3,49	0,80±0,116 a
Ехінацеї + мелатонін	36,6±2,58	48,6±5,91	0,76±0,063
Інтоксикація тетрахлорметаном	47,7±2,28	37,3±2,37	1,30±0,096 a
Інтоксикація тетрахлорметаном + ехінацеї	40,9±3,59	58,5±4,84	0,70±0,043
Інтоксикація тетрахлорметаном + мелатонін	39,6±2,99	46,7±3,90	0,85±0,085 a
Інтоксикація тетрахлорметаном + ехінацеї + мелатонін	25,3±3,71	43,7±2,25	0,81±0,099 a

**Примітка.** a – вірогідні зміни порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

При дослідженні стану окиснювальної модифікації білків у групі тварин, яким вводили внутрішньошлунково настоянку ехінацеї пурпурової у дозі 0,25мл/кг маси тварини за умов експериментального рівнодення, встановлено, що коефіцієнт R/B вірогідно не відрізняється від показників контролю ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

При введенні тваринам мелатоніну у дозі 3 мг/кг маси тварини за умов експериментального рівнодення у нирках щурів спостерігали підвищення вмісту ОМБ за коефіцієнтом R/B у середньому на 20% порівняно з контролем, і його значення становило 0,80±0,116 (табл. 2). Даний показник свідчить про зміщення рівноваги в нирках щурів у бік білків кислого характеру при дії мелатоніну за умов експериментального рівнодення.

При сумісному введенні тваринам двох препаратів з інтервалом у 5 хв (мелатоніну та настоянки ехінацеї пурпурової) в нирках щурів коефіцієнт R/B ступеня ОМБ становив 0,76±0,063 і вірогідно не відрізнявся від контролю (табл. 2).

Проведені нами гістохімічні дослідження ступеня окисної модифікації білків показали посилення процесів окиснення білків у нирках тварин, що отримували тетрахлорметан.

Відомо [2], що окиснення білків під дією активних форм кисню з утворенням альдегідо- чи кетогруп є однією із адаптаційних систем і стимулює активацію мультикаталітичних протеаз, що вибірково руйнують окиснені протеїни. При надмірному утворенні активних форм кисню, зокрема при оксидативному стресі, модифікація білків завершується утворенням кислих груп білків, що свідчить про глибоке порушення рівноваги про- й антиоксидантної системи.

Нами показано, що на 5-й день після отруєння тварин тетрахлорметаном у гістологічних препаратах тканин нирок переважала інтенсивність забарвлення спектра червоного кольору над синім – коефіцієнт R/B становив 1,30±0,096, що у середньому на 50% вище контролю (табл. 2).

Це свідчить про переважання білків кислого характеру над основними у гістологічних зрізах нирок тварин із токсичним ураженням (рис. 2).

Для корекції метаболічних порушень, викликаних отруєнням тетрахлорметаном, тваринам протягом 5-ти днів вводили настоянку ехінацеї пурпурової та оцінювали ступінь ОМБ у гістологічних зрізах нирок за коефіцієнтом R/B, який становив  $0,70 \pm 0,043$  і перебував у межах контролю ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

При введенні мелатоніну тваринам, ураженим тетрахлорметаном, було відзначено зниження коефіцієнта R/B ( $0,85 \pm 0,085$ ) у гістологічних зразках нирок щурів порівняно зі значенням при інтоксикації  $CCl_4$  у середньому на 35%, який ще залишався вище контролю на 25% (табл. 2).

Послідовне введення настоянки ехінацеї пурпурової та мелатоніну при токсичному ураженні тетрахлорметаном за умов експериментального рівнодення призвело до зниження вмісту ОМБ за коефіцієнтом R/B у зрізах нирок щурів на 38% порівняно з показниками при ураженні  $CCl_4$ , однак вірогідно не відрізнялися від значень контролю (табл. 2).

Отже, відмічено відновлювальний вплив настоянки ехінацеї пурпурової при інтоксикації тетрахлорметаном за умов експериментального рівнодення, про що свідчить наближення коефіцієнта R/B до показників контролю у нирках щурів, отруєних  $CCl_4$ , навіть при її п'ятиденному застосуванні. Уведення мелатоніну за цих же умов корегує кислотно-основну рівновагу у тканині нирок та зменшує вміст продуктів вільнорадикального окиснення білків, що підтверджує його антиоксидантні властивості.

При аналізі гістологічних зрізів на основі гістохімічної методики забарвлення бромфеноловим синім за Мікель-Кальво і при багаторазовому вимірюванні ступеня забарвлення цитоплазми клітин нирки роздільно у червоному та синьому спектрах було визначено коефіцієнт R/B, який охарактеризував динаміку рівноваги між кислими й основними білками нирок щурів за умов експериментального рівнодення та введення препаратів (настоянки ехінацеї пурпурової, мелатоніну та їхнього послідовного введення).

Ураження тварин тетрахлорметаном призводило до зростання коефіцієнта R/B порівняно з контролем і свідчило про зміщення рівноваги у бік переважання білків кислого характеру у гістологічних зрізах нирок.

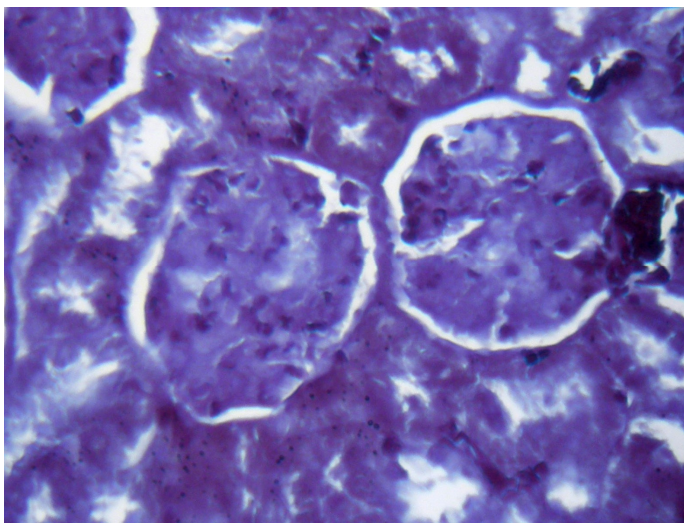


Рис. 2 Кіркова речовина нирки щура при токсичному тетрахлорметановому ураженні за умов експериментального рівнодення при гістохімічному забарвленні білків бромфеноловим синім за Мікель-Кальво. Об.  $40\times$ . к.  $10\times$ .

П'ятиразове введення настоянки ехінацеї пурпурової приводило до повного відновлення рівноваги між кислими та основними білками у нирках щурів, отруєних тетрачлорметаном.

Уведення мелатоніну та сумісне введення препаратів тваринам, ураженим тетрачлорметаном, приводило до часткової корекції окиснювальних процесів у нирках щурів.

1. Антиоксидантна система захисту організму: огляд / Беленічев І.Ф., Левицький Е.Л., Губський Ю.І. та ін. // Совр. пробл. токсикології. 2002. № 3. С. 18–32.
2. Дубинина Е. Е., Пустыгина А. В. Окислительная модификация протеинов, ее роль при патологических состояниях // Укр. біохім. журн. 2008. Т. 80. № 6. С. 5–18.
3. Мацьопа І. Поєднана дія настоянки ехінацеї пурпурової та мелатоніну на вміст відновленого глутатіону в нирках при токсичному гепатиті та за умов різної тривалості світлового періоду дня // Клінічна та експеримент. патологія. 2009. Т. 8. № 1. С. 37–41.
4. 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.
5. Токсикологические последствия окислительной модификации белков при различных патологических состояниях: обзор литературы / Губский Ю.И., Беленічев І. Ф., Левицький Е.Л. и др. // Современные проблемы токсикологии. 2003. № 5. С. 22–32.
6. Шендерюк О. П., Давиденко І. С. Спосіб вимірювання окислювальної модифікації білків в структурах плаценти // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2006. Т. 5. № 2. С. 101.

**ACCORDING OXIDATIVE MODIFICATION OF PROTEINS  
TO THE HISTOCHEMIE DATES IN THE RATS KIDNEY UNDER CONDITION  
OF INTOXICATION TETRACHLORMETANE AND INFLUENCE OF MELATONIN  
AND ECHINACEA PURPUREA TINCTURE**

**I. Matsiopa, N. Grygorieva, I. Davydenko, A. Velyka**

*Bukovinian State Medical University  
2, Teatralna Sq., Chernivtsi 58000, Ukraine  
e-mail: ihorlop73@mail.ru*

The influence of melatonin and Echinacea Purpurea tincture on the oxidative modification proteins (OMP) in the rats kidneys at intoxication tetrachlormetane under condition of exspermental equinox has been studied. The increase of degree of oxidative modification proteins by R/B coefficient in the rats kidneys under condition of intoxication tetrachlormetane has been showed. It was established that administration of melatonin and Echinacea Purpurea tincture during five days promotes regeneration the degree of OMP in the rats kidneys at tetrachloromethane intoxication.

*Key words:* melatonin, Echinacea Purpurea tincture, oxidative modification of proteins, kidney.

**ОКИСЛИТЕЛЬНО-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ БЕЛКИ ПО  
ГИСТОХИМИЧЕСКИМ ДАННЫМ В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ  
ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ И ДЕЙСТВИИ МЕЛАТОНИНА  
И НАСТОЙКИ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ**

**И. Мацёпа, Н. Григорьева, И. Давыденко, А. Великая**

*Буковинский государственный медицинский университет  
пл. Театральная, 2, Черновцы 58000, Украина  
e-mail: ihorlop73@mail.ru*

Изучено коррекционное влияние на содержание окислительно-модифицированных белков в почках крыс мелатонина, настойки эхинацеи пурпурной и их совместного введения в условиях экспериментального равноденствия при интоксикации тетрахлорметаном. Показано повышение степени окислительно-модифицированных белков, по коэффициенту R/B в почках крыс при условиях интоксикации тетрахлорметаном. Установлено, что в условиях экспериментального равноденствия пятидневное введение препаратов привело к снижению содержания ОМБ в почках крыс, интоксичированных тетрахлорметаном.

*Ключевые слова:* мелатонин, настойка эхинацеи пурпурной, окислительно-модифицированные белки, почки.

Стаття надійшла до редколегії 09.04.10  
Надійшла після доопрацювання 29.07.10  
Прийнята до друку 09.09.10