

соединений в условиях радиационного воздействия можно использовать экзогенные субстраты — источники анаэробного образования сукцината и сам сукцинат.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пространственное распределение дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий по длине тонкой кишки у крыс разного возраста / Б. З. Запиров [и др.] // Физиол. журн. СССР. — 1992. — № 9. — С. 98 – 105.
2. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Г. М. Франк [и др.]; под общ. ред. Г. М. Франка. — М.: Наука, 1973. — 196 с.
3. Коррекция метаболического ацидоза путем поддержания функций митохондрий / Е. И. Маевский [и др.]. — Пущино, 2001. — 155 с.

УДК 616.36-092.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕПАРАЦИОННОГО ЭНЗИМА MGMT С ПОМОЩЬЮ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДА В ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

Наконечная О. А., Безродная А. И.

**Харьковский национальный медицинский университет
г. Харьков, Украина**

Введение

Патоморфологические исследования, которые помогают выяснить возникновение и развитие изменений больного организма, уместны также для выяснения токсического влияния ксенобиотиков (КБ) на печень. В частности, иммуногистохимический анализ - это аналитический метод определения протеинов (антигенов) в клетках биологических тканей на основе реакции антиген-антитело. Из данных научной литературы известно, что алкилирование азотистых оснований может происходить в разных положениях, но алкилирование гуанина в O⁶-позиции имеет наиболее выраженный канцерогенный, цитотоксический и мутагенный потенциал. O⁶-алкилгуанин является одним из мутагенно-опасных аддуктов, поскольку с большой частотой приводит к ошибочному объединению азотистых оснований при репликации ДНК. Вместо цитозина O⁶-алкилгуанин объединяется с тиминном, в результате чего возникает замена типа G: C -> A: T [1].

В процессе репарации ДНК O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансфераза (MGMT) переносит алкильную группу с O⁶-позиции гуанина на собственный остаток цистеина, при этом необратимо инактивируясь. Таким образом MGMT защищает клетку от мутагенных и цитотоксических повреждений. Уровень экспрессии исследуемой алкилтрансферазы разный у разных индивидуумов, а также в различных тканях и органах одного и того же организма, в нормальных клетках и клетках опухолей одного и того же органа.

Цель

Исследовать экспрессию репарационного энзима MGMT с помощью иммуногистохимического метода в печени крыс в условиях влияния ксенобиотиков.

Материал и методы исследования

Проведен подострый токсикологический эксперимент на 40 белых крысах обоих полов популяции WAG продолжительностью 45 суток. Животные находились в стандартных условиях вивария.

Содержание и наблюдение за животными проводились в соответствии с положениями «Общезытических принципов экспериментов на животных», которые согласованы Первым Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых с экспериментальной и научной целью» (Страсбург, 1986).

В работе использованы образцы химически чистых веществ с регламентированными физико-химическими характеристиками: полиэтиленгликоль-400 (ПЭГ-400) («Барва-

фарм», г. Ивано-Франковск), этиленгликоль (ЭГ) и пропиленгликоль (ППГ) (ООО «Биолар», г. Харьков).

Эксперимент проведен на четырех группах животных: контрольной и трех опытных в количестве по 10 животных в каждой. Водные растворы ПЭГ-400, ППГ и ЭГ ежедневно натошак внутривенно вводились в дозе 1/10 ДЛ₅₀ с помощью металлического зонда. Контрольная группа крыс получала соответствующие объемы питьевой воды.

Расчет необходимой дозы КБ для подострого эксперимента осуществляли, исходя из известных данных о параметрах острой токсичности: 1/10 от среднелетальной дозы (ДЛ₅₀) исследуемых веществ соответственно составляли для ПЭГ-400 — 2,89 г/кг, ППГ — 3,25 г/кг, ЭГ — 0,55 г/кг [2]. По окончании эксперимента на 45 сутки животных умерщвляли методом цервикальной дислокации (О. Н. Елизарова, 1971).

Патоморфологическое исследования печени крыс проводили общепринятыми методами [3]. Печень крыс фиксировали 10 % раствором нейтрального формалина, проводили через батарею спиртов возрастающей крепости и заливали в парафиновые блоки. С помощью санного микротомы Микромед МС-2М готовили срезы (5–7 мкм). Иммуногистохимические исследования уровня экспрессии фермента MGMT проведен с использованием мышиных моноклональных антител производства фирмы «Thermo Fisher Scientific» (Великобритания). После инкубации с первичными антителами микросрезы обрабатывали конъюгатом с анти-(мышиным IgG). Визуализацию комплекса антиген-антитело выполняли с использованием 3,3'-диаминобензидина. Изучали срезы с помощью световой микроскопии на микроскопе Axiostar-plus (Zeiss, ФРГ).

Результаты исследования и их обсуждение

Иммуногистохимическая реакция на наличие антигена MGMT, который является репаративным энзимом ДНК, может быть показателем репаративного потенциала печени в нашем исследовании в условиях воздействия исследуемой группы КБ. Поскольку КБ являются мутагенными веществами, то актуальным было исследование уровня экспрессии MGMT в условиях воздействия ПЭГ-400, ППГ и ЭГ в дозе 1/10 ДЛ₅₀.

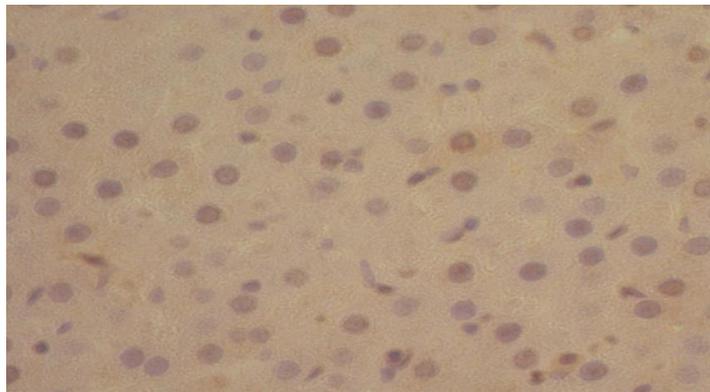


Рисунок 1 — Печень интактной крысы. Слабо выраженный уровень экспрессии маркера метилированной O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы. ИГХ реакция на MGMT с 3,3'-диаминобензидин визуализацией. Ув.: x 400

Нами было установлено, что наибольший уровень экспрессии MGMT наблюдался при воздействии ПЭГ-400. В образцах ткани печени гепатоциты с мечеными ядрами размещаются большими группами в средней части долей печени по 20–30 экземпляров. Тогда как между ними размещаются широкие поля с непомеченными гепатоцитами. Данное фрагментарное размещения достоверно связано с тем, что именно эти зоны печени первыми контактируют с кровью, поступающей из vena porte, а именно с кишечника. Местами эндотелий синусоид также меченый (рисунок 2).

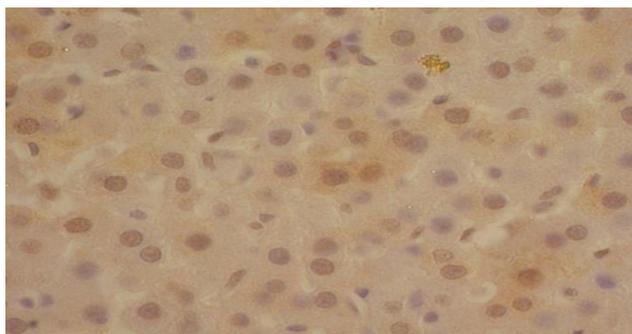


Рисунок 2 — Печень крысы в условиях 45 суточного воздействия ПЭГ-400 в дозе 1/10 ДЛ₅₀. Сильно выраженный уровень экспрессии маркера метилированной O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы. ИГХ реакция на MGMT с 3,3'-диаминобензидин визуализацией. Ув.: x 400

Почти одинаковый уровень экспрессии MGMT наблюдался при воздействии ППГ и ЭГ. Однако уровень экспрессии MGMT в условиях воздействия ЭГ был ниже, поскольку наблюдалось большое количество лизированных гепатоцитов, что скорее всего можно трактовать как результат воздействия наиболее токсичного ксенобиотика, который вызывает клеточную гибель путем апоптоза или некроза (рисунок 3, 4).

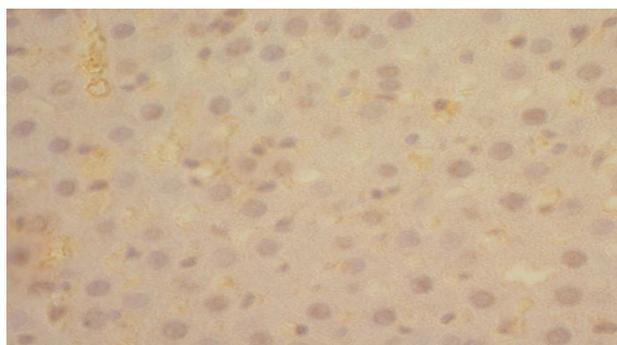


Рисунок 3 — Печень крысы в условиях 45 суточного воздействия ЭГ в дозе 1/10 ДЛ₅₀. Сильно выраженный уровень экспрессии маркера метилированной O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы. ИГХ реакция на MGMT с 3,3'-диаминобензидин визуализацией. Ув.: x 400

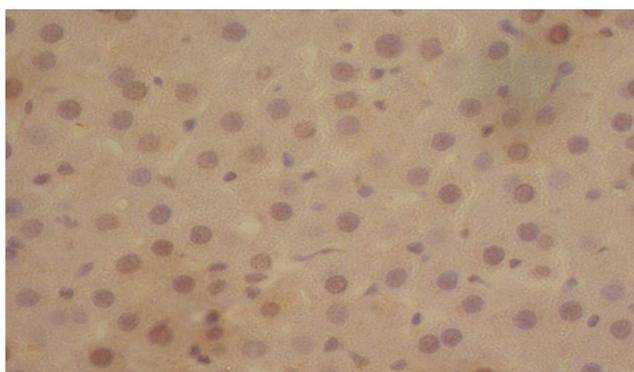


Рисунок 4 — Печень крысы в условиях 45 суточного воздействия ППГ в дозе 1/10 ДЛ₅₀. Сильно выраженный уровень экспрессии метилированной O⁶-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы. ИГХ реакция на MGMT с 3,3'-диаминобензидин визуализацией. Ув.: x 400

При морфометрическом исследовании особенностей экспрессии маркера MGMT нами было определено, что процент MGMT-меченых гепатоцитов существенно увеличивается по сравнению с интактной группой животных и имеет особенности зависимости от типа исследуемого КБ (рисунок 5).

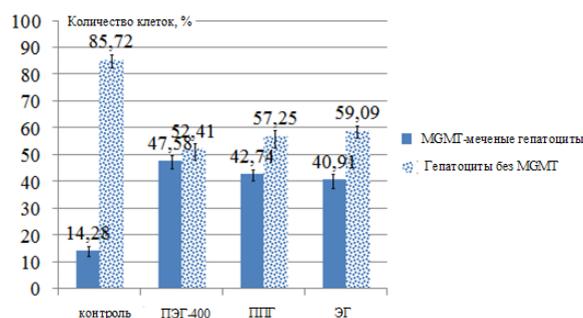


Рисунок 5 — Процент MGMT-меченых и MGMT-отрицательных гепатоцитов крыс после длительного воздействия ксенобиотиков: ЭГ, ПЭГ-400, ППГ в дозе 1/10 ДЛ₅₀. Данные представлены в форме $M \pm SE$

Установлено, что наибольший уровень экспрессии MGMT, то есть процент MGMT-меченых гепатоцитов наблюдался при воздействии ПЭГ-400 в дозе 1/10 ДЛ₅₀ и составлял $47,58 \pm 2,39$ %, что указывает на активацию репарационного потенциала клеток по сравнению с контрольной группой животных, в которой процент MGMT-меченых гепатоцитов составлял $14,28 \pm 2,39$ %, что в 3,33 раза меньше, чем в экспериментальных группах. В условиях воздействия ЭГ и ППГ процент MGMT-меченых гепатоцитов составлял $40,91 \pm 2,41$ % и $42,74 \pm 1,98$ % соответственно, что в 2,86 и 3 раза выше показателей контрольной группы, что также может свидетельствовать о существенной активации репарационных процессов ДНК, однако не так выражено, как в условиях воздействия ПЭГ-400.

Выводы

При иммуногистохимическом исследовании в ядрах гепатоцитов экспериментальных животных в условиях влияния исследуемых ксенобиотиков было определено увеличение процента MGMT-меченых гепатоцитов по сравнению с контрольной группой, что может свидетельствовать об активации репарационных процессов ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Безродна, А. І. Вплив блоксополімерів на основі оксипропілену та етилену на показники функціонального стану печінки щурів та корекція його порушень: дис... канд. біол. наук : спец.03.00.04 «Біохімія» / А. І. Безродна. — Харків, 2019. — 202 с.
2. Дымент, О. Н. Гликоли и другие производные окисей этилена и пропилена / О. Н. Дымент. — М., 1976. — 373 с.
3. Лилли, Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. — М., 1969. — 646 с.

УДК [577.1:378.147.018.43]:[378.6:61(476.2)]

ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ ДИСТАНЦИОННОГО ОБУЧЕНИЯ НА КАФЕДРЕ ОБЩЕЙ, БИООРГАНИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ УЧРЕЖДЕНИЯ ОБРАЗОВАНИЯ «ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*Никитина И. А.¹, Коваль А. Н.¹, Громыко М. В.¹,
Логвинович О. С.¹, Мазаник М. Е.¹, Грицук А. И.²*

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь,

²Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова

г. Одесса, Украина

Введение

Дистанционное обучение (ДО), как форма передачи знания, представляющая собой взаимодействие педагога и обучаемого на расстоянии с использованием современных информационных и телекоммуникационных технологий, представляет собой новую