

УДК: 577.215.3

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА GSTM ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Кутлина Т.Г.¹, Каримов Д.О.¹, Валова Я.В.^{1,2}, Мухаммадиева Г.Ф.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹, Смолянкин Д.А.¹, Байгильдин С.С.¹, Репина Э.Ф.¹

1 - ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

2 - Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

Эксперимент на крысах был проведен с целью изучения экспрессии гена GSTM в гепатоцитах через 24 и 72 часа после затравки тетрахлорметаном в разных дозах.

Кратность экспрессии GSTM повышалась при малых дозах тетрахлорметана (0,125 – 1 г/кг), через 24 часа. Максимум наблюдался при дозе 0,25 г/кг. При затравках высокими дозами наблюдалось истощение данного механизма детоксикации и кратность экспрессии не превышала данные показатели в группе контроля.

При анализе экспрессии этого гена через 72 часа после затравки наблюдалась обратно пропорциональная зависимость, то есть, чем выше была экспрессия на первые сутки, тем ниже она стала на третьи.

Ключевые слова: токсический гепатит, тетрахлорметан, экспрессия, глутатион-S-трансферазы

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

EXPRESSION OF GSTM GENE IN TOXIC LIVER DAMAGE OF EXPERIMENTAL ANIMALS

Kutlina T.G.¹, Karimov D.O.¹, Valova YA. V.^{1,2}, Mukhammadiyeva G.F.¹, Khusnutdinova N.YU.¹, Smolyankin D.A.¹, Bajgil'din S.S.¹, Repina E.F.¹

1 - Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

2 - Baskhirian State University, Ufa, Russia

An experiment in rats was conducted to study the expression of the GSTM gene in hepatocytes 24 and 72 hours after seeding with tetrachloromethane at different doses.

The multiplicity of GSTM expression was increased at low doses of carbon tetrachloride (0.125-1 g / kg), after 24 hours. The maximum was observed at a dose of 0.25 g / kg. At high doses, this detoxification mechanism was depleted and the multiplicity of expression did not exceed these parameters in the control group.

When analyzing the expression of this gene 72 hours after the primer, an inversely proportional dependence was observed, that is, the higher the expression was on the first day, the lower it became on the third day.

Key words: toxic hepatitis, carbon tetrachloride, expression, glutathione-S-transferase

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

В связи с растущим загрязнением окружающей среды и ростом промышленности токсическое поражение печени в настоящее время привлекает особое внимание многих исследователей. Печень занимает центральное место в процессах углеводного, белкового, липидного, пигментного метаболизма, а также в процессах детоксикации многочисленных веществ, попадающих в организм, как извне, так и из кишечника и, в частности, путем их окисления, конъюгирования, декарбоксилирования [1]. Воздействие на организм чужеродных веществ, обладающих токсическими свойствами, может оказывать значительное влияние на печень, приводящее к формированию ее токсического поражения. Развитие данного патологического состояния обусловлено несколькими группами этиологических факторов: интоксикацией гепатотропными веществами (тетрахлорметан, бензол), лекарственными препаратами (парацетамол, антидепрессанты, противовоспалительные средства, тетрациклин и др.), этанолом и его суррогатами. Токсические агенты приводят к развитию печеночной недостаточности, опухолям, гепатитам и циррозу [2].

Тетрахлорметан (ТХМ, CCl_4 , четыреххлористый углерод) является одним из наиболее хорошо изученных гепатотропных ядов. По своим физическим свойствам представляет бесцветную летучую жидкость, он плохо растворим в воде, обладает резким специфическим запахом [8]. Четыреххлористый углерод смешивается неполярными органическими растворителями, применяется в промышленности как растворитель жиров, при химической чистке одежды. В атмосферу CCl_4 поступает в составе промышленных выбросов предприятий химической промышленности. Четыреххлористый углерод образуется вместе с другими галогенопроизводными метана при хлорировании питьевой воды. Отравление экспериментальных животных CCl_4 по биохимическим показателям и морфологической характеристике близко к острым поражениям печени различной этиологии наблюдаемых у человека [4]. Характер поражения печени зависит от количества и концентрации вводимого ТХМ и продолжительности проводимого эксперимента. При метаболизме четыреххлористого углерода в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов под действием ферментов системы митохондриального окисления, в том числе цитохрома P450, образуются свободные радикалы, окисляющие митохондриальные липиды, что и обуславливает гепатотоксический эффект CCl_4 (рис. 1). Процесс окисления липидов ведет к распаду внутриклеточных мембран митохондрий, лизосом, высвобождению активных ферментов, денатурации белков с последующей гибелью клетки [6]. В ответ на повреждение происходит активизация антиоксидантной системы (АОС) клетки, в том числе системы глутатионов.

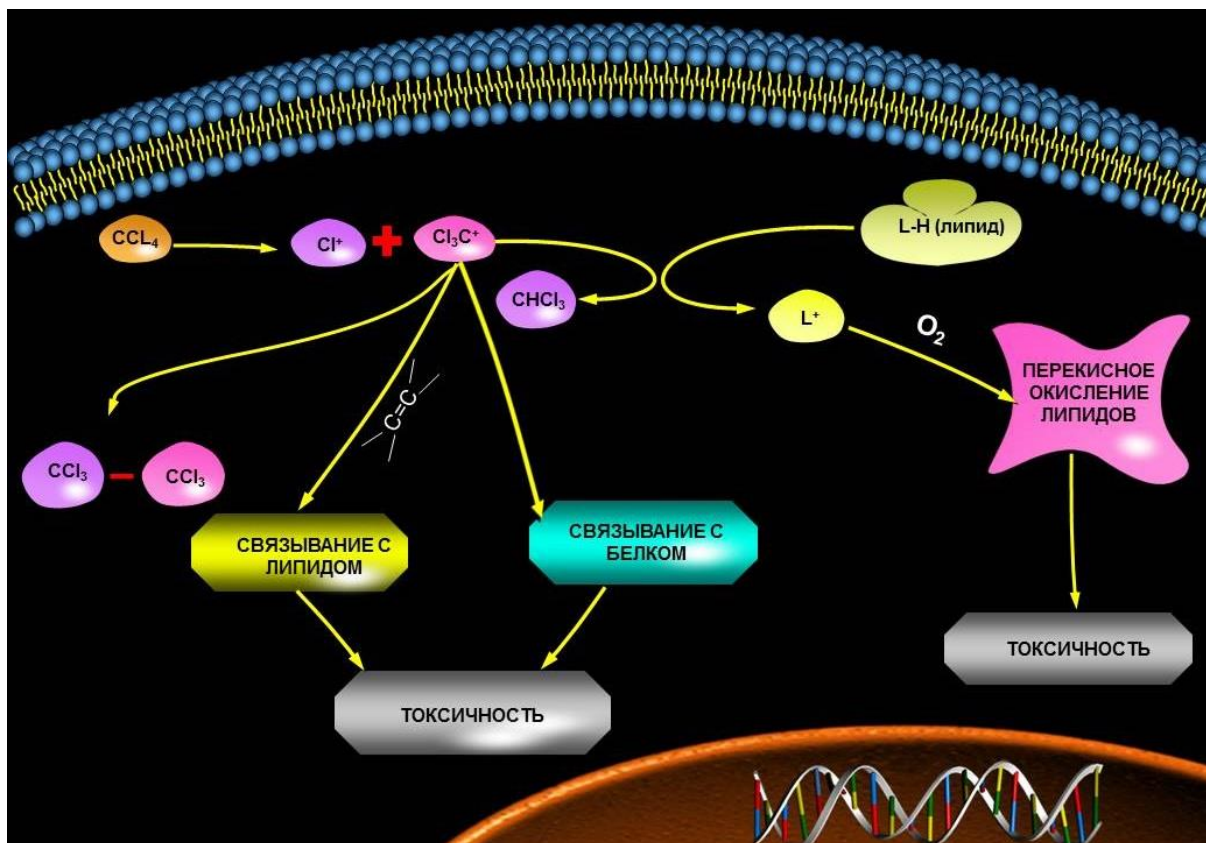


Рисунок 1. Механизм токсического действия тетрахлорметана

Глутатион-S-трансферазы (GSTs) - семейство метаболических изоферментов эукариотической и прокариотической фазы II, они наиболее известны своей способностью катализировать конъюгацию восстановленной формы глутатиона (GSH) к ксенобиотическим субстратам с целью детоксикации. Семейство GST состоит из трех надсемейств: цитозольного, митохондриального и микросомального. GSTs – ключевой компонент второй фазы детоксикации ксенобиотиков. Описаны несколько изоформ глутатион-S-трансфераз (A1, M1, P1, T1 и др.). Гены, которые кодируют белки глутатион-S-трансферазной активности (GSTT, GSTP и GSTM), известные как ферменты 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков [9]. Гены GSTT, GSTM и GSTP кодируют различные типы глутатион-S-трансфераз – T1, M1 и P1. Глутатион-S-трансферазы активно участвуют в детоксикации ряда ксенобиотиков путем их связывания с глутатионом и играют ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и мутаций ДНК. Экспрессия генов GST имеет тканеспецифические особенности: так, GSTM выявляется во многих тканях, в том числе в лимфоидных органах и лимфоцитах, фермент также обнаружен в клетках печени [10].

Целью работы явилось исследование количественной экспрессии гена GSTM в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

Материал и методы исследования: токсический гепатит у белых крыс вызывали путем введения тетрахлорметана (ТХМ) в виде 50%-ного масляного раствора в дозе 0,125 - 4 г/кг массы животного подкожно, однократно. Печень декапитированных крыс подвергали исследованию спустя 24 и 72 часа после затравки. Животным контрольной группы подкожно вводили оливковое масло. Всего в опытах использовано 84 белых

беспородных крыс (12 крыс в контрольной группе и 72 – в экспериментальной) с массой 170 – 190 грамм. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами: Рекомендациями комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, рекомендациями ВОЗ, рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Кусочки печени сразу после декапитации и вскрытия замораживали жидким азотом и заливали Extract RNA (ЗАО Евроген). Для определения функционального состояния печени нами было применено определенное количество методик: экстракция тотальной РНК тризоловым методом, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени на приборе Rotor Gene (QIAGEN). Изучение экспрессии генов в печени крыс в норме и при ХТГ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров фирмы «Евроген», содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green. Статистические данные, полученные в опытах, обрабатывали с помощью критерия (t) Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты исследования:

При анализе экспрессии гена GSTM при введении тетрахлорметана получились следующие результаты. При 24 часовом воздействии кратность экспрессии плавно повышалась на промежутке от 0 г/кг до 0,25 г/кг (-0,45; 2,63; 4,38; $F=4,78$; $p=0,001$). В интервале от 0,25 г/кг до 0,5 г/кг наблюдается понижение экспрессии (4,38; 2,31). Затем, на промежутке от 0,5 г/кг до 1 г/кг изменение экспрессии практически не наблюдается (2,31; 2,02). При увеличении дозировки от 1 г/кг до 4 г/кг происходит изменение кратности экспрессии в сторону снижения (2,02; 0,71; -0,56).

Противоположные результаты получились при анализе кратности экспрессии того же гена при 72 часовом воздействии ТХМ с дозировкой до 0,5 г/кг. В интервале от 0 г/кг до 0,5 г/кг наблюдалось понижение уровня экспрессии (-0,45; -1,34; -4,15; $F=6,15$; $p=0,001$). На промежутке от 0,25 г/кг до 0,5 г/кг произошло резкое ее повышение (-4,15; 1,32) и начиная с дозы 0,5 г/кг экспрессия снижалась (1,32; 0,86; -0,52; -4,30). Особенно резкое ее понижение наблюдается в промежутке от 2 г/кг до 4 г/кг (-0,52; -4,30) (рис.2).

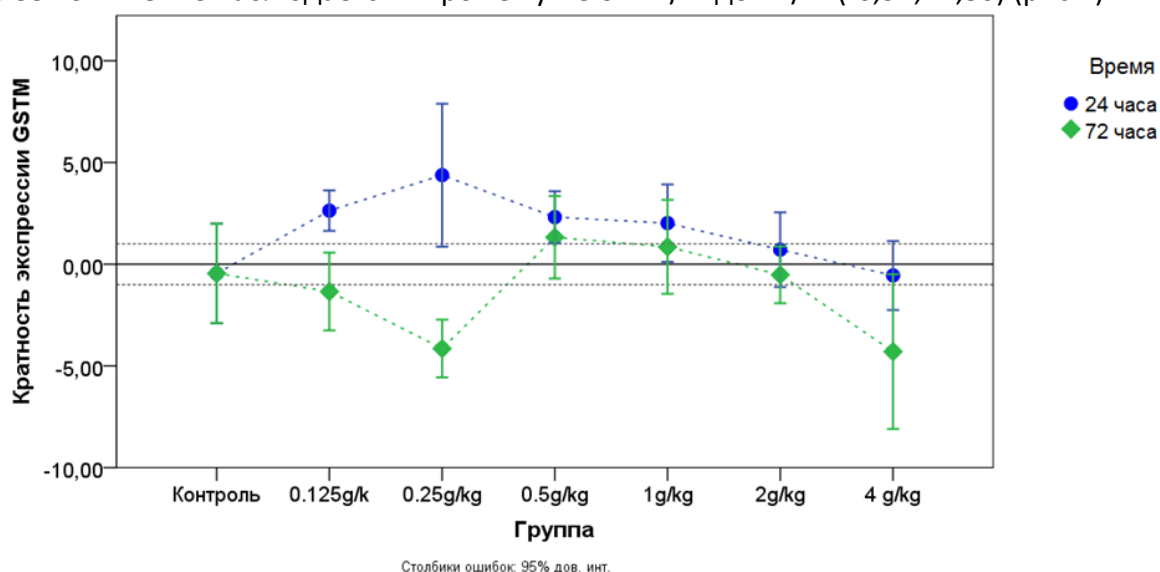


Рисунок 2. Кратность экспрессии гена GSTM при 24 и 72 часовых воздействиях с увеличением дозы от 0 до 4 г/кг

Обсуждение:

Основным эффектом тетрахлорметана на организм человека и животных является гепатотоксичность. Но воздействие четыреххлористого углерода на живой организм этим не ограничивается. Образующиеся при метаболизме CCl_4 свободные радикалы способны оказывать повреждающий эффект и на другие органы пищеварительной системы и, в первую очередь, на поджелудочную железу [5]. Особенно это выражено при пероральном поступлении CCl_4 в организм животного или человека. Моделируемые с использованием четыреххлористого углерода экспериментальные поражения печени по биохимическим изменениям и морфологическим характеристикам достаточно близки к острым поражениям печени различной этиологии у человека. В механизме действия CCl_4 на мембраны гепатоцитов одним из ведущих моментов является активация процессов перекисного окисления липидов [3]. Острый токсический гепатит характеризуется массивным центрлобулярным некрозом гепатоцитов, что приводит к тяжелым нарушениям функции печени. Неблагоприятный прогноз обусловлен тяжестью печеночного повреждения, быстротой развития характерных морфологических нарушений, не оставляющих времени для полноценной реализации репаративных функций, а также развитием полиорганной недостаточности [7].

Изучая кратность экспрессии GSTM мы наблюдали повышение экспрессии при относительно малых дозах тетрахлорметана (0,125 – 1 г/кг). Максимум при 0,25 г/кг. По-видимому, истощение данного механизма детоксикации наблюдается быстрее и при дозах 2 и 4 г/кг кратность экспрессии не превышает данные показатели в контроле.

Интересно отметить, что при анализе экспрессии этого гена через 72 часа после затравки наблюдалась обратно пропорциональная зависимость, то есть, чем выше была экспрессия на первые сутки, тем ниже она стала на третьи. Данное обстоятельство можно объяснить подавлением экспрессии этого гена после максимального ее повышения в первые сутки.

Список литературы:

1. Белякин С. А. Роль биопсии печени в диагностике алкогольного гепатита / С .А. Белякин, А. Н. Бобров, С.В. Плюснин // Воен. мед.журн. – 2011. – № 5. – С. 68–69.
2. Восстановление детоксиционной способности организма при эндотоксикозе под действием антиоксидантной терапии / А. П. Власов, Н. Д. Бунятыян, О.Н. Быханова, Т.И. Григорьева, В.А. Шибитов, С.Г. Анаскин // Клинич. фармакология и терапия. – 2013. – № 1. – С. 51 - 54.
3. Галимова С.Ф. Лекарственные поражения печени / С. Ф. Галимова // Российский журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2012. – Т. XXII, № 3. – С. 38 – 48.
4. Изменение токсичности и иммунотоксичности тетрахлор-метана и карбофоса под влиянием 2,4,6-трифенил-4н-селенопирана и их связь с Р-450-зависимой монооксигеназной системой / П. Ф. Забродский, Б. И. Древоко, В. Г. Мандыч, В.Г. Германчук, С.В. Балашов, А.В. Кузьмин // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71, № 6. – С. 42–44.
5. Влияние тетрахлорметана на показатели иммунной системы / П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, В. Ф. Киричук, Н. И. Карпенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 1. – С. 56 – 58.
6. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы и клиническая характеристика детей, родившихся у родителей,

- больных сахарным диабетом 1-го типа / Н. П. Микаелян, А. Е. Гурина, А. В. Микаелян, С.В. Новикова // Российский мед. журн. – 2013. – № 5. – С. 33 – 36.
7. Темнов А. А. Контроль продукции активных форм кислорода лейкоцитами позволяет прогнозировать устойчивость организма к стрессорному повреждению / А. А. Темнов, Н. А. Онищенко // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2007. – № 2. – С. 9 – 11.
 8. Arrak J.K. Toxicopathological and biochemical effects of Carbon Tetrachloride with residual accumulation in Liver of mice / J.K. Arrak // Kufa journal For Veterinary Medical Sciences. – 2013. Vol. 4, № 1. – P. 57 – 68.
 9. Hayashi H. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models / H. Hayashi, T. Sakai // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. — 2011. — Vol. 300(5). — P. 729 – 738.
 10. Mullen K. D. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization / K. D. Mullen, A. J. McCullough // Hepatology. — 1989. — № 9. — P. 500 – 503.

Поступила/Received: 12.03.2018
Принята в печать/Accepted: 19.03.2018