

УДК 577.218

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА CHK1 ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

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

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

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия

К токсическим поражениям печени относится широкая группа заболеваний, характеризующихся морфологическими изменениями ткани печени при гепатотоксическом действии веществ различного происхождения. Цель настоящего исследования состояла в анализе изменений экспрессии гена Chk1, вызванных введением разных доз тетрахлорметана. Для моделирования токсического поражения печени использовались белые беспородные крысы-самцы, которым вводили оливковое масло (контрольная группа) и тетрахлорметан в разных дозах (опытная группа). Печень декапитированных крыс подвергали исследованию спустя 24 и 72 часа после затравки. Анализ экспрессии исследуемого гена в печени крыс проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Установлено дозозависимое изменение экспрессии гена Chk1, что позволяет делать предположения о некоторых механизмах развития патологических процессов в печени.

Ключевые слова: токсическое поражение печени, экспрессия генов, тетрахлорметан.

Для цитирования: Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Бакиров А.Б., Кутлина Т.Г., Валова Я.В., Репина Э.Ф., Хуснутдинова Н.Ю. Особенности экспрессии гена CHK1 при экспериментальном токсическом поражении печени. Медицина труда и экология человека. 2019;2:53-56.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10021>

SPECIFICITIES OF CHK 1 GENE EXPRESSION IN EXPERIMENTAL TOXIC LIVER DAMAGE

Mukhammadieva G.F., Karimov D.O., Bakirov A.B.^{1,2}, Kutlina T.G., Valova Ya.V., Repina E.F., Khusnutdinova N.Yu.

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

2- FSBEI HE «Bashkir State Medical University» MZ RF, Ufa, Russia

Toxic liver lesions include a wide group of diseases characterized by morphological changes in the liver tissue during the hepatotoxic action of substances of different origin. The purpose of this study was to analyze changes in the expression of the Chk1 gene, caused by the administration of different doses of carbon tetrachloride. To modulate toxic liver damage, mongrel male albino rats were used to administer olive oil (control group) and carbon tetrachloride at different doses (experimental group). The livers of decapitated rats were examined after 24 and 72 hours of administration. Analysis of the gene expression studied in the rat liver was performed by the method of polymerase chain reaction with reverse transcription in real time. A dose-dependent change in the Chk1 gene expression has been established, which allows making assumptions about some of the mechanisms of pathological processes development in the liver.

Keywords: toxic liver damage, gene expression, carbon tetrachloride.

For quotation: Mukhammadieva G.F., Karimov D.O., Bakirov A.B., Kutlina T.G., Valova Ya.V., Repina E.F., Khusnutdinova N.Yu. Specificities of CHK 1 gene expression in experimental Toxic liver damage. *Occupational health and human ecology*.2019;2:53-56.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10021>

К токсическим поражениям печени относится широкая группа заболеваний, характеризующихся морфологическими изменениями ткани печени при гепатотоксическом действии веществ различного происхождения, в том числе и промышленного. Токсические поражения печени могут протекать в форме массивного некроза гепатоцитов с развитием острой печеночной недостаточности либо в форме хронической интоксикации с постепенным нарастанием дегенеративных изменений в печени. Патогенетические механизмы повреждения печеночных структур многообразны, для них характерно развитие цитолиза, холестаза, воспалительной реакции, нарушения регенерации и метаболических процессов, окислительного стресса [1].

В последние годы как в России, так и за рубежом наблюдается рост распространенности токсических гепатитов [2, 3]. Это обусловлено малой изученностью молекулярных механизмов данных заболеваний. В этом отношении перспективным является исследование особенностей функционирования генетического аппарата в разных условиях и при разных воздействиях. В настоящее время хорошо известны молекулярные механизмы токсического действия тетрахлорметана (CCl₄), который широко используется для моделирования поражения печени у животных [4]. Изучение экспрессии генов в условиях экспериментального токсического поражения печени может помочь уточнить их роль в разворачивании патологического процесса.

Ключевыми сигнальными белками в клеточном ответе на повреждение ДНК являются серин-треониновые киназы Chk1 (киназа 1 контрольной точки клеточного цикла) и CHK2 (киназа 2 контрольной точки клеточного цикла). При повреждении ДНК активируются сенсорные киназы ATM и ATR, которые, в свою очередь, фосфорилируют эффекторные киназы Chk1 и Chk2 соответственно и совместно с ними участвуют в остановке прогрессии клеточного цикла [5]. CHK1 регулирует ход клеточного цикла и является основным фактором в реакции на повреждение ДНК в клетке.

Целью данной работы является анализ изменений экспрессии гена *Chk1*, вызванных введением разных доз CCl₄.

Материалы и методы исследования.

В качестве объекта для моделирования токсического поражения печени использовались 84 белые беспородные крысы-самцы массой 170–190 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Использование животных в эксперименте проводилось в соответствии с правилами, регламентированными законодательством Российской Федерации и рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов в научных или иных целях. Все животные были разделены на две группы: контрольную (n=12) и опытную (n=72). Крысам контрольной группы вводили равное количество оливкового масла. Животным опытной группы вводили однократно подкожно CCl₄ в дозе 0,125, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 г/кг массы тела в виде 50% раствора в оливковом масле. На каждую дозу использовали 6 крыс. Через 24 и 72 ч после введения CCl₄ животных декапитировали и извлекали печень.

Суммарную РНК выделяли из замороженных, измельченных в жидком азоте образцов печени с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия), согласно инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции и получение кДНК на основе выделенной РНК производили с помощью набора MMLV RT kit и праймеров олиго(dT)15 («Евроген», Рос-

сия). Для определения уровня экспрессии гена *Chk1* проводили ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия). В качестве референсного гена использовали *Gapdh*.

Все статистические расчеты производили с помощью программного пакета IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM, США). Использовали дисперсионный анализ (ANOVA), а также критерий Краскела – Уоллиса. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

В эксперименте нами были обнаружены определенные закономерности изменения экспрессии гена *Chk1* через 24 и 72 ч от момента затравки животных CCl_4 . При введении CCl_4 в дозе 0,125 г/кг через 24 ч в печени крыс отмечалось снижение экспрессии гена *Chk1* в сравнении с контрольной группой (рис.). Введение CCl_4 в более высоких дозах увеличивало экспрессию исследуемого гена, достигавшую максимального уровня при дозе 4 г/кг ($p = 0,142$). Таким образом, изменения в экспрессии гена *Chk1* имели более выраженный характер при более высокой дозе токсиканта, при этом статистически значимые различия отсутствовали.

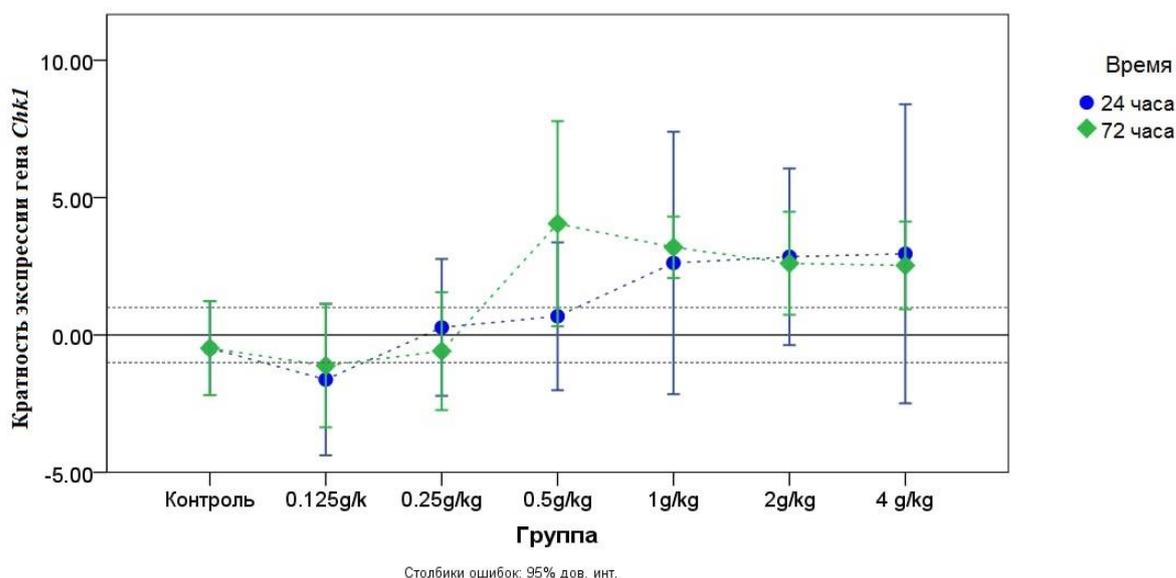


Рис. Кратность экспрессии гена *Chk1* через 24 и 72 ч после воздействия разных доз CCl_4

Интоксикация животных CCl_4 в дозе 0,125 г/кг через 72 ч после воздействия приводила к небольшому снижению экспрессии гена *Chk1* по сравнению с контролем (рис.). Уровень транскриптов гена *Chk1* оставался практически неизменным при увеличении дозы CCl_4 до 0,25 г/кг, тогда как при дозе 0,5 г/кг выявлена наибольшая экспрессия гена *Chk1*, которая возрастала в 4 раза относительно контроля ($p = 0,003$). С увеличением дозы токсиканта наблюдалась тенденция к снижению уровня экспрессии исследуемого гена, но по-прежнему он оставался выше контрольного ($p < 0,05$).

Ген *Chk1* кодирует синтез белка-фермента чекпойнт-киназы 1. Белковый продукт данного гена принимает участие в механизме блокировки клеточного цикла в фазах S и G_2/M [6]. В результате проведенного анализа установлено, что через 24 ч после воздействия CCl_4 экспрессия гена *Chk1* дозозависимо повышается. Возможно, киназа 1 контрольной точки клеточного цикла активируется в ответ на нарушения структуры ДНК, т.к. является одним из ключевых компонентов системы проведения сигналов от поврежденной ДНК к различным эффекторам [7]. Схожая тенденция к повышению экспрессии гена *Chk1* при увеличении дозы CCl_4 наблюдалась через 72 часа после воздействия токсиканта. Однако в диапазоне доз CCl_4

от 1,0 до 4,0 г/кг уровень экспрессии гена *Chk1* сохраняется фактически неизменным. Вероятно, это обусловлено тем, что при воздействии токсических факторов CHK1 фосфорилирует фосфатазу CDC25A, направляя ее на деградацию, что приводит к задержке или остановке клеточного цикла [5].

Заключение.

Таким образом, токсическое воздействие CCl₄ на экспериментальных животных приводит к повышению экспрессии гена *Chk1*, контролирующего клеточный цикл. Знание механизмов прогрессии клеточного цикла при токсическом воздействии имеет большое значение для разработки способов коррекции патологических состояний печени.

Список литературы:

1. Панченко Л.Ф., Давыдов Б.В., Теребилина Н.Н., Баронец В.Ю., Наумова Т.А. Окислительный стресс в патогенезе алкогольной болезни печени. Вопросы наркологии. 2013; № 2: 82-91.
2. Агзамова Г.С., Алиева А.М. Клинические особенности течения токсических гепатитов и их лечение (обзор литературы). Медицина труда и промышленная экология. 2009; № 12: 44-47.
3. Авдеева М.Г., Кулбужева М.И., Колодько Е.И., Черникова Н.В., Запашняя О.В. Проблемы лечения токсического гепатита на фоне хронического вирусного поражения печени HCV-этиологии. Клинический пример успешной терапии. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2018; 23(1): 50-56.
4. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit. Rev. Toxicol. 2003; 33(2): 105-136.
5. Smith J., Tho L.M., Xu N., Gillespie D.A. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Adv Cancer Res. 2010; 108: 73-112.
6. Janetka J.W., Ashwell S., Zabludoff S., Lyne P. Inhibitors of checkpoint kinases: from discovery to the clinic. Curr Opin Drug Discov Devel. 2007; 10(4): 473-86.
7. Reinhardt H.C., Yaffe M.B. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. Curr. Opin. Cell Biol. 2009; 21(2): 245-255.

References:

1. Panchenko L.F., Davydov B.V., Terebilina N.N., Baronets V.Yu., Naumova T.A. Oxidative stress in the pathogenesis of alcoholic liver disease. Journal of Addiction Problems. 2013; 2: 82-91.
2. Agzamova G.S., Alieva A.M. Clinical peculiarities and treatment of toxic hepatitis (review of literature). Occupational health and industrial ecology. 2009;12: 44-47.
3. Avdeeva M.G., Kulbuzheva M.I., Kolod'koYe.I., Chernikova N.V., Zapashnyaya O.V. Problems of treatment of toxic hepatitis on the background of chronic viral lesion of HCV-etiology. Clinical example of successful therapy. Epidemiology and Infectious Diseases. 2018; 23(1): 50-56.
4. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit. Rev. Toxicol. 2003; 33(2): 105-136.
5. Smith J., Tho L.M., Xu N., Gillespie D.A. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Adv Cancer Res. 2010; 108: 73-112.
6. Janetka J.W., Ashwell S., Zabludoff S., Lyne P. Inhibitors of checkpoint kinases: from discovery to the clinic. Curr Opin Drug Discov Devel. 2007; 10(4): 473-86.
7. Reinhardt H.C., Yaffe M.B. Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. Curr. Opin. Cell Biol. 2009; 21(2): 245-255.

Поступила/Received: 24.03.2019

Принята в печать/Accepted: 29.04.2019