

УДК: 577.215.3

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА НМОХ1 ПРИ СС14-ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ

Валова Я.В.^{1,2}, Зиатдинова М.М.¹, Мухаммадиева Г.Ф.¹, Каримов Д.О.¹, Якупова Т.Г.¹, Кудояров Э.Р.¹, Каримов Д.Д.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹, Репина Э.Ф.¹

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

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, Россия

В настоящее время заболевания печени представляют собой серьезную проблему здравоохранения во всем мире, являясь частой причиной ранней нетрудоспособности и смертности населения. В связи с этим поиск эффективной терапии и мер профилактики различных типов токсических повреждений печени представляет собой актуальную задачу для современной гепатологии. Цель работы заключалась в оценке влияния гепатопротекторных препаратов (Гептор, Мексидол и оксиметилурацил) на транскрипционную активность гена Нтох1 у крыс с СС14-индуцированным гепатитом. Анализ экспрессии генов в печени крыс проводили методом ПЦР в режиме реального времени. В результате проведенного эксперимента было показано, что спустя 24 часа после воздействия СС14 наиболее выраженное влияние на экспрессию гена отмечалось при применении оксиметилурацила, тогда как через 72 часа все препараты показали примерно одинаковый эффект.

Ключевые слова: острый токсический гепатит, экспрессия генов, тетрахлорметан, гемоксигеназа, Мексидол, Гептор, оксиметилурацил.

Для цитирования: Валова Я.В.^{1,2}, Зиатдинова М.М., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Якупова Т.Г.¹, Кудояров Э.Р.¹, Каримов Д.Д.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹, Репина Э.Ф.¹ ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА НМОХ1 ПРИ СС14-ИНДУЦИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ. Медицина труда и экология человека. 2020; 3:80-86

Для корреспонденции: Валова Яна Валерьевна – младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», e-mail: a.juk@yandex.ru.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 07.02.2020 № УГ-43 «О присуждении в 2020 году грантов Республики Башкортостан молодым ученым».

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10311>

EFFECTS OF VARIOUS HEPATOPROTECTIVE AGENTS ON HMOX1 GENE EXPRESSION IN CCl₄-INDUCED TOXIC LIVER DAMAGE

Valova YA. V.^{1,2}, Ziatdinova M.M.¹, Mukhammadieva G.F.¹, Karimov D.O.¹, Yakupova T.G.¹,
Kudoyarov E.R.¹, Karimov D.D.¹, Khusnutdinova N.Yu.¹, Repina E.F.¹

¹ Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia

² Bashkir state university, Ufa, Russia

Currently, liver disease is a serious medical problem throughout the world, being a frequent cause of early disability and mortality. In this regard, the search for effective therapy and preventive measures for various types of toxic liver damage is an urgent problem for modern hepatology. The aim of this work was to assess the effect of hepatoprotective drugs (heptor, mexidol, and oxymethyluracil) on the transcriptional activity of the Hmox1 gene in rats with CCl₄-induced hepatitis. Analysis of gene expression in rat liver was carried out by real-time PCR methods. As a result of the experiment, it was shown that 24 hours after exposure to CCl₄, the most pronounced effect on gene expression was observed when using oxymethyluracil, while after 72 hours all substances showed approximately the same effect.

Keywords: acute toxic hepatitis, gene expression, carbon tetrachloride, heme oxygenase, mexidol, heptor, oxymethyluracil.

For citation: Valova Ya.V.^{1,2}, Ziatdinova M.M., Mukhammadieva G. F., Karimov D.O., Yakupova T.G.¹, Kudoyarov E.R.¹, Karimov D.D.¹, Khusnutdinova N.Yu.¹, Repina E.F.¹ EFFECTS OF VARIOUS HEPATOPROTECTIVE AGENTS ON HMOX1 GENE EXPRESSION IN CCl₄-INDUCED TOXIC LIVER DAMAGE. *Occupational health and human ecology*. 2020; 3:80-86

For correspondence: Yana V. Valova - Junior Researcher at the Department of Toxicology and Genetics with the Experimental Clinic of Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, e-mail: q.juk@yandex.ru.

Financing. The research was supported by the Bashkortostan grant to young scientists of 07.02.2020 № UG-43 "The Republic of Bashkortostan grants awarded to young scientists in 2020".

Conflict of interest: The authors declare they have no conflict of interest.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2020-10311>

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), за последние 20 лет наблюдается неуклонный рост количества больных с хроническими и острыми поражениями печени различной этиологии [1].

Заболевания печени представляют собой одну из важных проблем здравоохранения во всем мире, являясь частой причиной ранней нетрудоспособности и смертности населения.

Понятие «токсические поражения печени» охватывает большую группу заболеваний, связанных с гепатотоксическим действием различных ксенобиотиков (лекарственные средства, промышленные яды, алкоголь), вызывающих патологические изменения в печени и ведущих к нарушениям ее функции [2]. Наиболее важное токсикологическое значение среди промышленных ядов имеют хлорированные углеводороды и полихлорированные бифенилы, которые находят широкое применение в промышленности как растворитель жиров, смол, каучука, так и в сельском хозяйстве [3, 4]. Тетрахлорметан (CCl₄) является

классическим гепатотропным агентом, и даже непродолжительное поступление высоких доз ТХМ в организм через неповрежденную кожу, дыхательные пути, пищеварительный тракт способствует развитию жировой дистрофии печени [5]. Особую опасность представляют острые отравления CCl_4 , возникающие при аварийных ситуациях на производстве, при которых летальность может достигать до 30% [6]. Несмотря на то что случаи острых отравлений достаточно редки, подострое и хроническое поражение печени отмечают достаточно часто [7, 8].

В настоящее время известно, что токсическое действие ксенобиотиков на клетки печени обусловлено не столько самим веществом, сколько реактивными метаболитами, образующимися после его биотрансформации системой монооксигеназного окисления гепатоцитов [9]. Такие активированные метаболиты являются чрезвычайно реакционноспособными и могут вызывать перекисное окисление важнейших клеточных элементов, приводя к их полной деструкции и, как следствие, к гибели клетки [10].

Ведущую роль в поддержании окислительно-восстановительного баланса в печени играет гемоксигеназная сигнальная система. Изофермент гемоксигеназа 1 (*Hmox1*) катализирует реакцию трансформации свободного гема в биливердин и является цитопротективным ферментом с противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, который индуцируется в ответ на окислительный стресс и считается одним из наиболее чувствительных показателей повреждения клеток [11].

Несмотря на успехи современной медицины в попытках описать общие механизмы развития токсического поражения печени, до сих пор остаются малоизученными вопросы о различии этих механизмов в зависимости от типа гепатотоксина, его дозы и периодичности его поступления в организм [12]. В связи с этим поиски эффективной терапии и мер профилактики различных типов токсических повреждений печени являются актуальными задачами современной гепатологии.

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния гепатопротекторных препаратов (Гептор, Мексидол и оксиметилурацил) на уровень экспрессии гена *Hmox1* у крыс с CCl_4 -индуцированным гепатитом.

Материалы и методы

Моделирование острого токсического гепатита проводили на самцах белых беспородных крыс массой 170-190 г путем подкожного введения тетрахлорметана (CCl_4) в виде 50% раствора на оливковом масле из расчета 2 г/кг массы тела, однократно. Всего в опытах использовано 60 крыс (12 крыс в контрольной группе и 48 – в экспериментальной). Животным контрольной группы подкожно вводили оливковое масло. Животным остальных трех групп наряду с CCl_4 вводили соответственно: 1) внутривенно Гептор в дозе 0,09 мг/кг; 2) подкожно Мексидол в дозе 1 мг/кг; 3) перорально оксиметилурацил (ОМУ) в дозе 50 мг/кг. Животных декапитировали спустя 24 и 72 часа после затравки. Кусочки печени сразу после декапитации и вскрытия замораживали жидким азотом и заливали Extract RNA (ЗАО Евроген). Для определения функционального состояния печени использовались следующие методы: экстракция тотальной РНК тризолом, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени на приборе Rotor Gene (QIAGEN). Анализ экспрессии генов в печени крыс проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров фирмы «Евроген»,

содержащих интеркалирующий краситель SYBR Green. Нормирование уровня экспрессии проводили по гену *Gapdh*. Количественные данные обрабатывали по критерию (t) Стьюдента и с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Нами проведен анализ кратности экспрессии гена *Htox1* при затравке CCl_4 на фоне гепатопротекторов. При анализе кратности экспрессии гена *Htox1* в 24-часовом эксперименте наблюдались статистически значимые различия ($F=6,588$, $p=0,001$) (рис. 1).

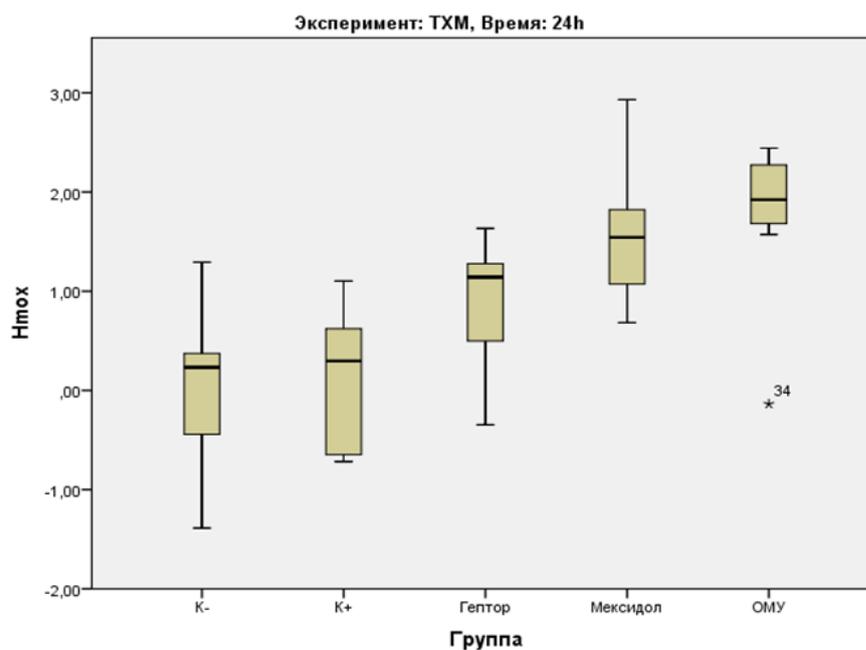


Рис. 1. Кратность экспрессии гена *Htox1* при интоксикации CCl_4 под влиянием гепатопротекторов через 24 ч

Спустя сутки после затравки CCl_4 экспрессия гена гемоксигеназы 1 в группе без лечения осталась на уровне контроля. После введения Гептора было зафиксировано незначительное повышение экспрессии исследуемого гена относительно групп положительного и отрицательного контроля, однако эти изменения не достигли уровня статистической значимости. Максимальный уровень транскриптов наблюдался в группе получавшей ОМУ ($1,73 \pm 0,33$). Положительный эффект также был отмечен в группе после введения Мексидола ($1,56 \pm 0,28$). Сравнительный анализ кратности экспрессии гена *Htox1* показал статистически значимые различия после лечения Мексидолом и ОМУ по сравнению с группами положительного и отрицательного контроля ($p=0,029$, $p=0,008$, $p=0,011$, $p=0,003$ соответственно).

При анализе кратности экспрессии гена *Htox1* в 72-часовом эксперименте были выявлены статистически значимые различия ($F=10,01$, $p=0,000$) (рис. 2).

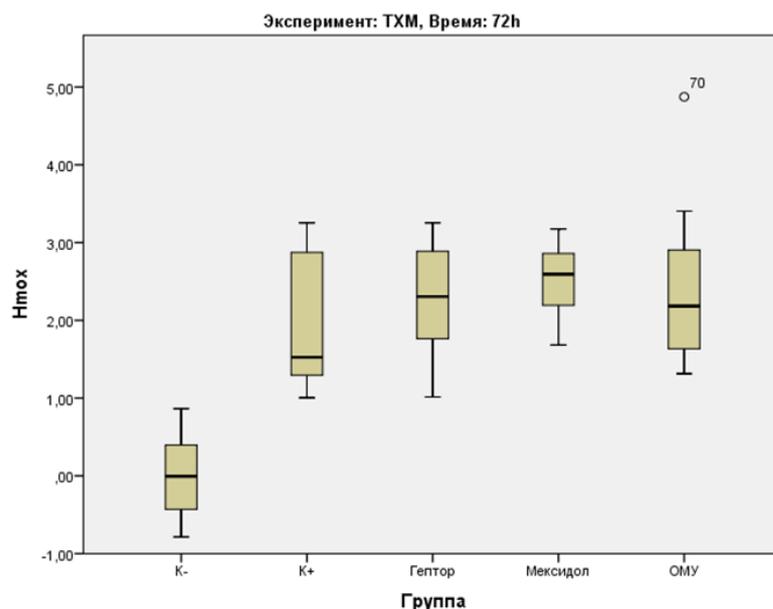


Рис. 2. Кратность экспрессии гена *Hmox1* при интоксикации CCl_4 под влиянием гепатопротекторов через 72 ч

Спустя 3 суток после затравки CCl_4 во всех группах наблюдается статистическое значимое повышение экспрессии гена гемоксигеназы 1 по сравнению с группой отрицательного контроля. При этом наиболее высоких значений она достигает в группах, получавших после затравки Мексидол ($2,51 \pm 0,21$, $p=0,000$) и ОМУ ($2,49 \pm 0,47$, $p=0,000$). Положительный эффект также был отмечен в группе после введения Гептора ($2,27 \pm 0,31$, $p=0,000$). В то же время статистически значимых различий уровня экспрессии гена *Hmox1* между группами с лечением и положительным контролем не обнаружено.

Известно, что свободные радикалы, образующиеся при метаболизме CCl_4 в большом количестве, активируют процессы перекисного окисления, тем самым приводя к декомпенсации АОС [13]. Такие нарушения проявляются, прежде всего, в снижении концентрации основных антиокислительных ферментов, таких как каталаза, глутатионпероксидаза и др., а также внутрипеченочной концентрации глутатиона [14].

В нашем эксперименте через 24 часа после воздействия CCl_4 не отмечалось выраженного воздействия токсиканта на экспрессию гена, тогда как через 72 часа происходило резкое повышение уровня его мРНК. Отсутствие ответа на первые сутки после введения токсиканта может быть связано со сниженной экспрессией гена *Nfe2l2*, являющегося транскрипционным регулятором экспрессии *Hmox1*, в связи с истощением антиоксидантной системы, вызванным CCl_4 -индуцированным окислительным стрессом. Интересно отметить, что уже через сутки после применения гепатопротекторов происходит значительное повышение уровня мРНК исследуемого гена. Такой положительный эффект продолжается и через 72 часа. Ранее показано, что некоторые вещества способны положительно влиять на экспрессию *Nfe2l2* и, следовательно, *Hmox1* [15]. Наибольшее значение кратности экспрессии спустя сутки было зарегистрировано при применении ОМУ, что дает возможность предположить, что при интоксикации CCl_4 лучший эффект наблюдается при применении ОМУ.

Исследование выполнено при поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 07.02.2020 № УГ-43 «О присуждении в 2020 году грантов Республики Башкортостан молодым ученым».

Список литературы:

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/ru>
2. О. М. Антоненко. Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции. Медицинский совет. 2013; №. 6: 45-51
3. А.Ю. Бушманова. Токсические профессиональные поражения печени: методические рекомендации. М.: 2006.
4. В.А. Мышкин, Р.Б. Ибатуллина, А.Б. Бакиров. Поражения печени химическими веществами. Уфа, 2007.
5. С. П. Перетягин, С. Ю. Большухин, А. К. Мартусевич. Экспериментальная токсикология тетрахлорметана: оценка влияния на систему липопероксидации. Теоретическая и прикладная экология. 2012; №. 3: 55-59.
6. Н. А. Муфазалова и др. Повреждающее воздействие тетрахлорметана на функциональное состояние мононуклеарных фагоцитов. Международный научно-исследовательский журнал. 2015; 2 (33): 48-52.
7. В.А. Мышкин, А.Б. Бакиров, Р.Б. Ибатуллина. Поражение печени химическими веществами. Функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция. Уфа: Гилем; 2007.
8. В.А. Черешнев, В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев. Гепатопротекция при химических воздействиях. Москва-Уфа; 2012.
9. С. Н. Голиков, И. В. Саноцкий, Л. А. Тиунов. Общие механизмы токсического действия. АМН СССР. Л.: Медицина; 1986.
10. Л. В. Кравченко, Н. В. Трусов, М. А. Ускова и др. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса. Токсикологический вестник. 2009; № 1: 12-18.
11. Volti G. L. et al. Natural heme oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function. World journal of gastroenterology: WJG. 2008; T. 14 (40): 6122.
12. А. А. Пентюк, Л. В. Мороз, О. В. Паламарчук. Поражения печени ксенобиотиками. Современные проблемы токсикологии. 2001; №. 1: 8
13. Altomare E., Vendemiale G., Albano O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases. Life sciences. 1988; T. 43(12): 991-998.
14. Mahmoodzadeh Y., Mazani M., Rezagholizadeh L. Hepatoprotective Effect of Methanolic Tanacetum Parthenium Extract on CCl4-Induced Liver Damage in Rats. Toxicology Reports. 2017.
15. Lee J. S., Surh Y. J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. Cancer letters. 2005; T. 224 (2): 171-184.

References:

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/ru>
2. O.M. Antonenko. Toxic liver damage: methods of pharmacological correction. Medical council. 2013; № 6: 45-51
3. A.Yu. Bushmanova. Toxic occupational liver damage: guidelines. Moscow: 2006.
4. V.A. Myshkin, R.B. Ibatullina, A.B. Bakirov. Chemical-induced liver damage. Ufa, 2007.
5. S. P. Peretyagin, S. Yu. Bolshukhin, A. K. Martusevich. Experimental toxicology of carbon tetrachloride: evaluation of the impact on the lipid peroxidation system. Theoretical and Applied Ecology. 2012; № 3: 55-59.
6. N.A. Mufazalova et al. The damaging effect of carbon tetrachloride on the functional state of mononuclear phagocytes. International research journal. 2015; 2 (33): 48-52
7. V.A. Myshkin, A.B. Bakirov, R.B. Ibatullina. Chemical-induced liver damage. Functional and metabolic disorders, pharmacological correction. Ufa: Gilem; 2007.
8. V.A. Chereshev, V.A. Myshkin, D.A. Enikeev. Hepatoprotection with chemical exposure. Moscow-Ufa; 2012.
9. S. N. Golikov, I. V. Sanotsky, L. A. Tiunov. General mechanisms of toxic action. The USSR Academy of Medical Sciences. L. : Medicine; 1986.
10. L. V. Kravchenko, N. V. Trusov, M. A. Uskova et al. Characterization of the acute toxic effect of carbon tetrachloride as a model of oxidative stress. Toxicological Bulletin. 2009; № 1: 12-18.
11. Volti G. L. et al. Natural heme oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function. World journal of gastroenterology: WJG. 2008;T. 14 (40): 6122.
12. A. A. Pentiuk, L. V. Moroz, O. V. Palamarchuk. Xenobiotic-induced liver damage. Modern problems of toxicology. 2001; № 1: 8
13. Altomare E., Vendemiale G., Albano O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases. Life sciences. 1988;T. 43(12): 991-998.
14. Mahmoodzadeh Y., Mazani M., Rezagholizadeh L. Hepatoprotective Effect of MethanolicTanacetum Parthenium Extract on CCl4-Induced Liver Damage in Rats. Toxicology Reports. 2017.
15. Lee J. S., Surh Y. J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. Cancer letters. 2005; T. 224 (2): 171-184.

Поступила/Received: 1.09.2020

Принята в печать/Accepted: 10.09.2020