

УДК 615.9

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПЕЧЕНИ КРЫС ЧЕРЕЗ 24 ЧАСА ПОСЛЕ ИНДУКЦИИ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Рябова Ю.В.¹, Каримов Д.О.^{1,3}, Репина Э.Ф.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹, Смолянкин Д.А.¹, Якупова Т.Г.¹, Афанасьева А.А.²

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

² ФГКОУ ВО УЮИ МВД России, Уфа, Россия

³ ФГБНУ «Национальный НИИ общественного здоровья имени Н.А. Семашко», Москва, Россия

Гепатопатии, как следствие воздействий на печень, могут развиваться скрыто и прогрессировать бессимптомно, что обуславливает важность разработки и внедрения более эффективных методов ранней диагностики и мониторинга состояния печени.

Цель исследования: оценка биохимических и молекулярных изменений в печени крыс через 24 часа после индукции острого токсического гепатита тетрахлорметаном для уточнения ранних механизмов токсического повреждения этого органа.

Материалы и методы. Для моделирования токсического гепатита использовали однократное подкожное введение 50% раствора тетрахлорметана в дозах от 0,125 до 4,0 г/кг массы тела аутбредным белым крысам-самцам. По завершении 24 часов воздействия оценивали биохимические показатели активности АлАТ, АсАТ, ЛДГ и ЩФ в сыворотке крови; использовали образцы ткани печени для оценки экспрессии генов *GSTT*, *Gclc*, *Cdkn*, *Check1*, *Ripk*, *Casp7*, *Hmox1*, *Nf2l2*. Временной интервал в 24 часа позволяет выявить как текущие патологические реакции, так и начальные адаптивные ответы. Статистическая обработка данных выполнена с использованием пакета SciPy на Python 3.10, значимость различий определялась при уровне $p < 0,05$.

Результаты. Через 24 часа после введения ТХМ активность АсАТ и АлАТ статистически значимо возрастала с увеличением дозы токсиканта, в то время как активность ЛДГ и ЩФ оставалась практически неизменной. Изменения экспрессии были зафиксированы для генов *GSTT*, но не *Gclc*; *Cdkn*, но не *Check1*; *Ripk* и в большей степени *Casp7*; *Nf2l2* и *Hmox1* на высоких дозах воздействия.

Заключение. Воздействие тетрахлорметана даже на низком уровне доз вызывает активацию генов ответственных за остановку клеточного цикла, активацию систем антиоксидантной защиты и репаративных механизмов в тканях печени без достоверных изменений биохимических параметров. При высоких дозах токсиканта компенсаторные возможности печени снижаются из-за метаболической депрессии в клетках печени, в конечном итоге приводящей к их гибели. При этом наблюдается повышение активности ферментов в сыворотки крови, указывающее на повреждения тканей печени.

Ключевые слова: токсичность, токсический гепатит, тетрахлорметан, эксперимент, *in vivo*, экспрессия генов

Для цитирования: Рябова Ю.В., Каримов Д.О., Репина Э.Ф., Хуснутдинова Н.Ю., Смолянкин Д.А., Якупова Т.Г. Динамика биохимических и молекулярных изменений в печени крыс при остром токсическом гепатите, индуцированном тетрахлорметаном. Медицина труда и экология человека. 2024; 3: 147-162.

Для корреспонденции: Рябова Юлия Владимировна, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией токсикологии отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, e-mail: ryabovaiuvl@gmail.com

Финансирование: работа проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Научное обоснование национальной системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, управления рисками здоровью и повышения качества жизни населения России» на 2021-2025 гг. п. б.1.8, № гос. регистрации 121062100058-8.

Конфликт интересов: авторы сообщают об отсутствии явного либо потенциального конфликта интересов в связи с публикацией данной статьи.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2024-10309>

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR-GENETIC CHANGES IN THE LIVER OF RATS 24 HOURS AFTER INDUCTION OF ACUTE TOXIC HEPATITIS BY CARBON TETRACHLORIDE

Ryabova Yu.V. ¹, Karimov D.O. ^{1,3}, Repina E.F. ¹, Khusnutdinova N.Yu. ¹, Smolyankin D.A. ¹, Yakupova T.G. ¹, Afanasyeva A.A. ²

¹ Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russian Federation

² FSBEI HB ULI MIA of Russian Federation, Ufa, Russian Federation

³ The Semashko National Research Institute of Public Health, Russia

Hepatopathies, as a consequence of liver damage, can develop insidiously and progress asymptotically, which underscores the importance of developing and implementing more effective methods for early diagnosis and monitoring of liver conditions.

Objective: To evaluate the biochemical and molecular changes in the liver of rats 24 hours after the induction of acute toxic hepatitis by carbon tetrachloride (CCl₄) to clarify the early mechanisms of toxic liver damage.

Materials and Methods: Acute toxic hepatitis was modeled by a single subcutaneous injection of a 50% solution of carbon tetrachloride at doses ranging from 0.125 to 4.0 g/kg body weight in outbred male white rats. After 24 hours of exposure, biochemical parameters of ALT, AST, LDH, and ALP activity in the blood serum were assessed; liver tissue samples were used to evaluate the expression of the genes *GSTT*, *Gclc*, *Cdkn*, *Check1*, *Ripk*, *Casp7*, *Hmox1*, and *Nf2l2*. The 24-hour time interval allows the detection of both ongoing pathological reactions and initial adaptive responses. Statistical data analysis was performed using the SciPy package in Python 3.10, with significance determined at $p < 0.05$.

Results: Twenty-four hours after CCl₄ administration, ALT and AST activities significantly increased with the dose of the toxicant, whereas LDH and ALP activities remained virtually unchanged. Gene expression changes were recorded for *GSTT*, but not *Gclc*; *Cdkn*, but not *Check1*; *Ripk*, and to a greater extent *Casp7*; *Nf2l2* and *Hmox1* at higher doses.

Conclusion: Even at low doses, carbon tetrachloride exposure activates genes responsible for cell cycle arrest, antioxidant defense systems, and reparative mechanisms in liver tissues without significant changes in biochemical parameters. At higher toxicant doses, the compensatory capacity of the liver diminishes due to metabolic depression in liver cells, ultimately leading to their death. This is accompanied by increased enzyme activity in the blood serum, indicating liver tissue damage.

Keywords: toxicity, toxic hepatitis, carbon tetrachloride, experiment, in vivo, gene expression

Citation: Ryabova Yu.V., Karimov D.O., Repina E.F., Khusnutdinova N.Yu., Smolyankin D.A., Yakupova T.G., Afanasyeva A.A. Biochemical and molecular-genetic changes in the liver of rats 24 hours after induction of acute toxic hepatitis by carbon tetrachloride. *Occupational Health and Human Ecology*. 2024; 3: 147-162.

Correspondence: Yulia V. Ryabova, Ph.D., Head of the Toxicology Laboratory, Department of Toxicology and Genetics with an Experimental Laboratory Animal Clinic, e-mail: ryabovaiuvl@gmail.com

Financing: This work was funded by a grant under the sectoral research program of Rospotrebnadzor "Scientific Justification of the National System for Ensuring Sanitary and Epidemiological Well-being, Risk Management for Health, and Improving the Quality of Life of the Russian Population" for 2021-2025, point 6.1.8, State Registration No. 121062100058-8.

Conflict of interest: The authors declare no apparent or potential conflict of interest in relation to the publication of this article.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24412/2411-3794-2024-10309>

Печень, являясь центральным органом в системе детоксикации организма, выступает основным органом-мишенью для широкого спектра повреждающих химических агентов. Существует множество видов производств с воздействием гепатотоксинов, часть из которых используются и в других видах деятельности человека, в том числе в быту [1-3]. Гепатопатии, как следствие воздействий на печень, могут развиваться скрыто и прогрессировать бессимптомно, что делает их диагностику особенно сложной. Эти заболевания могут возникать под влиянием как экзогенных токсинов, так и эндогенных факторов, что значительно усложняет их своевременное выявление и лечение. В результате такие заболевания нередко выявляются на поздних стадиях, когда клиническая симптоматика уже выражена, а прогноз для пациента становится менее благоприятным [2]. Это подчеркивает важность разработки и внедрения более эффективных методов ранней диагностики и мониторинга состояния печени.

Для моделирования токсического гепатита нами был выбран тетрахлорметан (ТХМ), известный и широко применяемый в исследовательских целях гепатотоксикант. Такой выбор обеспечивает стандартизацию экспериментов, что позволяет воспроизводить результаты и сравнивать данные между различными лабораториями, повышая надёжность исследований. Ранее ТХМ применялся в быту как чистящее и обезжиривающее средство, а также в промышленности для растворения масел, жиров, восков и лакокрасочных материалов, однако ныне его использование существенно ограничено ввиду риска для здоровья человека [4,5]. Механизм гепатотоксического действия ТХМ обусловлены особенностью его метаболизма в печени, в результате которого образуются активные метаболиты, вызывающие оксидативный стресс. Перекисное окисление липидов ведет к

нарушению целостности клеточных мембран, включая мембраны эндоплазматического ретикулума, митохондрий и лизосом [6]. Дисфункция митохондрий способствует снижению жизнеспособности гепатоцитов [7], в ответ на повреждение развиваются воспалительные процессы, сопровождающиеся гибелью клеток [8].

Оценка биохимических и молекулярных изменений в печени крыс после индукции острого гепатита тетрахлорметаном необходима для понимания ранних механизмов развития токсического повреждения печени. Временной интервал в 24 часа позволяет выявить как текущие патологические реакции, включая окислительный стресс, истощение антиоксидантных резервов и активацию процессов апоптоза, так и начальные адаптивные ответы, такие как активация системы глутатиона.

Таким образом, **цель** нашего исследования заключается в оценке биохимических и молекулярных изменений в печени крыс через 24 часа после индукции острого токсического гепатита тетрахлорметаном для выявления ранних механизмов токсического повреждения.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование было запланировано и проведено в соответствии с международными стандартами о гуманном обращении с животными и требованиями законодательства Российской Федерации в отношении лабораторных животных, получило локальное биоэтическое заключение №02/2022. Животные содержались в условиях специально организованного вивария по 6 особей в клетке при температуре $21 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажности воздуха в пределах 50-70%, получали сбалансированный сухой комбикормом «Чара» (ООО «МультиТорг», Россия), и были обеспечены свободным доступом к чистой питьевой воде.

Для проведения экспериментального исследования аутобредные крысы самцы массой 200-220 г. были разделены случайным образом на 7 групп по 6 особей в каждой. В качестве токсиканта использовали 50% раствор тетрахлорметана, для моделирования интоксикации его вводили однократно и подкожно в дозах 0,125, 0,5, 1, 2 и 4 г/кг массы тела (далее – м.т.). Выбор доз был обусловлен ранее проведенными экспериментальными исследованиями коллектива авторов: дозы были достаточны для формирования интоксикации, недостаточны для причинения чрезмерных страданий лабораторным крысам, а также имели достаточно широкий диапазон для изучения воздействия ТХМ. Рафинированное оливковое масло

служило носителем и контрольным веществом (отрицательный контроль), которое вводилось подкожно однократно в дозе 2 г/кг м.т.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось с применением углекислого газа и с последующей декапитацией. Для биохимических исследований использовалась сыворотка крови экспериментальных животных. Биохимические показатели, отражающие метаболизм и функциональное состояние печени, определялись на лабораторном фотометре «Stat Fax 3300» («Awareness Technology», США). Фиксировали активность аланинаминотрансферазы (далее – АлАТ), аспартатаминотрансферазы (далее – АсАТ), лактатдегидрогеназы (далее – ЛДГ), щелочной фосфатазы (далее – ЩФ). Для оценки изменений на молекулярном уровне были выбраны нижеперечисленные гены – антиоксидантного ответа и глутатионового метаболизма, гены-регуляторы фаз клеточного цикла и гены, связанные с программируемой клеточной гибелью. После декапитации и вскрытия животных образцы печени замораживали в жидком азоте и обрабатывали раствором ExtractRNA («Евроген», Россия). Применяли экстракцию тотальной РНК, обратную транскрипцию и ПЦР-амплификацию в режиме реального времени на приборе RotorGene («QIAGEN», Германия). Синтез кДНК осуществляли на основе тотальной РНК с применением набора MMLV RT kit и праймеров олиго(dT)₁₅ («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию выполняли на амплификаторе Rotor-Gene Q («QIAGEN», Германия) с SYBR Green. Праймеры для полимеразной цепной реакции были разработаны с помощью программы PrimerQuest («IDT», США) и синтезированы коммерческой фирмой («Евроген», Россия). Экспрессию генов нормировали по уровню *GAPDH*.

Изменение экспрессии генов регуляции клеточной защиты от окислительного стресса оценивали с помощью генов *Hmox1*, гемоксигеназы-1, и *Nf2l2*, ядерного фактора эритроидного происхождения 2. *Nf2l2* является регулятором клеточного антиоксидантного ответа, активируя экспрессию множества генов, кодирующих антиоксидантные ферменты и белки детоксикации [9]. *Hmox1* кодирует фермент гем-оксигеназу, которая опосредует катаболизм гема, расщепляя гем с образованием биливердина, оксида углерода и свободное железо. Активация *Hmox1* считается не только одним из наиболее чувствительных и надежных индикаторов клеточного окислительного стресса, но и адаптивным механизмом для защиты клеток от окислительного повреждения [10].

В качестве маркеров состояния глутатион-S-трансферазы оценивались уровни экспрессии *GSTT* и *Gclc*. *Gclc*, гамма-глутамилцистеин синтетаза, был выбран в качестве гена, кодирующий каталитическую субъединицу глутаматцистеиновой лигазы, ключевого фермента в синтезе глутатиона [11], снижение экспрессии которого в клетках может приводить к снижению уровня глутатиона в них. Ген *GSTT*, глутатион S-трансфераза тета, был выбран среди 16 других представителей семейства глутатион-S-трансфераз [12] исходя из предположений о его значительной роли в дезактивации активных форм кислорода [13], с которыми тесно связан патогенез острой интоксикации ТХМ [6]. Кроме того, *GSTT*, по-видимому, является одним из наиболее древних представителей семейства глутатион-S-трансфераз, что может свидетельствовать о его ключевой роли в функционировании антиоксидантной системы организма [12, 14].

Фиксировали изменение экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла *Check1* и семейства *Cdkn*. Активация генов семейства ингибиторов циклин-зависимых киназ, *Cdkn*, способна оказывать воздействие на регуляцию клеточного цикла, обеспечивая контроль над процессами клеточного деления в ответ на повреждения ДНК. Эти гены способны инициировать остановку клеточного цикла в фазах G1 или G2, что позволяет клеткам восстанавливать поврежденные участки ДНК перед возобновлением деления [15]. *Check1* кодирует серин/треонин-специфическую протеинкиназу, которая способна принимать участие в остановке клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК в переходе из фазы G2 в M. Она также может участвовать в механизмах репарации ДНК, активируя различные факторы репарации [16].

Оценивалась экспрессия генов, участвующих в инициации и реализации апоптотических процессов. Семейство генов *Ripk* представляют собой серин/треонин-киназы, которые принимают участие в передаче сигналов, связанных с клеточной смертью (путем некроптоза или апоптоза), воспалительными и иммунными реакциями [17]. Ген *Casp7* кодирует серин/треонин-специфическую протеазу, которая активируется в ответ на различные сигналы, включая активацию других каспаз, и является одним из «ключевых исполнителей» в механизме клеточной смерти. Она участвует в расщеплении клеточных субстратов, что вызывает характерные морфологические изменения, связанные с апоптозом, включая конденсацию ядерного материала и формирование апоптотических телец [18].

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием статистического пакета SciPy на языке Python 3.10. Для проверки нормальности распределения признаков в исследуемых группах применялся критерий Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении данных значимость различий между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа и апостериорных критериев Тьюки и Тамхейна. Результаты представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка. Различия признавали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ данных выполнялся с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 21.0 («IBM», США).

Результаты. Оценка изменений биохимических параметров сыворотки крови контрольной и опытных групп экспериментальных животных приведены в таблице 1. Активность АсАТ возрастала с увеличением дозы, достигая статистически значимых показателей в группах, получавших ТХМ в дозе 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,015$), 1,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$), 2,0 г/кг м.т. ($p = 0,047$) и 4,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$). Не достигли уровня статистической значимости изменения активности этого фермента в группах, получавших ТХМ в дозе 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,452$) и 0,5 г/кг м.т. ($p = 0,200$). Активность АлАТ оставалась на уровне контрольных значений в группах, получавших ТХМ в дозах 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,653$), 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,810$) и 0,5 г/кг м.т. ($p = 0,967$), однако при увеличении дозы в дальнейшем демонстрировала статистически значимые различия в группах, получавших ТХМ в дозах 1,0 г/кг м.т. ($p = 0,009$), 2,0 г/кг м.т. ($p = 0,008$) и 4,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$). Изменение активности ЛДГ не достигло уровня статистической значимости в группе, получавшей ТХМ в дозе 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,498$), 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,731$), 0,5 г/кг м.т. ($p = 0,311$), 1 г/кг м.т. ($p = 0,330$), 2 г/кг м.т. ($p = 0,854$), 4 г/кг м.т. ($p = 0,797$). Изменение активности ЩФ достигло уровня статистической значимости в сравнении с контролем в группе, получавшей ТХМ в дозе 1,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$), но не 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,289$), 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,640$), 0,5 г/кг м.т. ($p = 0,523$), 2 г/кг м.т. ($p = 0,172$), 4 г/кг м.т. ($p = 0,235$).

Оценка изменений экспрессии генов *GSTT*, *Gclc*, *Cdkn*, *Check1*, *Ripk*, *Casp7*, *Hmox1*, *Nf2l2* в тканях печени контрольной и опытных групп экспериментальных животных приведены в таблицах 2 и 3. Экспрессия *GSTT* оставалась на уровне контрольных значений в группе, получавшей 0,125 г/кг ТХМ ($p = 0,346$), но при увеличении дозы до 0,25 г/кг и 0,5 г/кг м.т. была зафиксирована статистически значимая его активация ($p = 0,016$ и $p = 0,000$ соответственно). В группе, получавшей 1,0 г/кг ТХМ, экспрессия *GSTT* увеличилась, но статистически значимых различий по сравнению

с контролем не наблюдалось ($p=0,055$). Значимое повышение экспрессии было отмечено при дозе 2,0 г/кг м.т. ($p=0,002$), в то время как при максимальной дозе 4,0 г/кг м.т. статистически значимых различий не выявлено ($p=0,138$). Экспрессия *Gclc* оставалась на уровне контрольных значений в группах, получавших ТХМ в дозах 0,125 г/кг м.т. ($p=0,626$), 0,25 г/кг м.т. ($p=0,737$) и 0,5 г/кг м.т. ($p=0,878$), и не демонстрировала статистически значимых изменений. Аналогично, при дозировке 1,0 г/кг м.т. ($p=0,981$) и 2,0 г/кг м.т. ($p=0,657$), различия с контрольной группой также оставались незначимыми. Введение максимальной дозы 4,0 г/кг м.т. показало снижение экспрессии *Gclc*, но статистически значимых различий с контролем не выявлено ($p=0,719$).

Таблица 1. Изменение активности печеночных ферментов после однократного воздействия ТХМ в дозах от 0,125 до 4,0 г/ кг м.т.

Table 1. Changes in liver enzyme activity following a single exposure to CCl_4 at doses ranging from 0.125 to 4.0 g/kg body weight.

| Доза ТХМ, г/ кг м.т. | Параметр, Ед/л | | | |
|-------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| | АсАТ | АлАТ | ЛДГ | ЩФ |
| 0 | 184,77±17,45 | 68,95± 11,82 | 1657,05± 262,50 | 683,87± 61,12 |
| 0,125 | 202,93±13,28 | 59,52± 7,65 | 2259,17± 52,95 | 567,15± 64,48 |
| 0,25 | 262,23±22,15* | 64,73± 5,50 | 2015,55± 163,72 | 630,53± 67,08 |
| 0,5 | 249,03±40,18 | 67,85± 11,59 | 2287,50± 126,05 | 600,78± 68,87 |
| 1,0 | 405,53±42,76* | 125,42± 16,64* | 2212,00± 100,90 | 1074,22± 74,63* |
| 2,0 | 357,72±74,55* | 200,27± 44,18* | 1925,00± 371,92 | 1108,05± 241,90 |
| 4,0 | 483,53±12,39* | 270,55± 33,51* | 2080,17± 227,60 | 895,30± 126,65 |

Примечание: Символом «*» обозначено отличие от соответствующей величины в контрольной группе, $p < 0,05$.

Оценка изменений экспрессии гена *Cdkn* показала статистически значимое увеличение его активности в группе, получавшей 0,125 г/кг ТХМ ($p=0,000$), которая продолжала возрастать при дозах 0,25 г/кг м.т. ($p=0,000$) и 0,5 г/кг м.т. ($p=0,000$). Максимальный уровень экспрессии был отмечен при дозировке 0,5 г/кг м.т., после чего наблюдалось снижение экспрессии при дозах 1,0 г/кг м.т. ($p=0,001$) и 2,0 г/кг м.т. ($p=0,009$), хотя различия с контрольной группой оставались значимыми. В группе, получавшей 4,0 г/кг м.т., экспрессия несколько возросла ($p=0,005$).

Экспрессия *Check1* оставалась на уровне контрольных значений в группах, получавших 0,125 г/кг ($p = 0,521$), 0,25 г/кг ($p = 0,645$) и 0,5 г/кг ТХМ ($p = 0,608$). Повышение дозы до 1,0 г/кг привело к увеличению экспрессии, но без статистически значимых различий ($p = 0,336$). Значимые изменения также отсутствовали при дозах 2,0 г/кг ($p = 0,151$) и 4,0 г/кг ($p = 0,398$).

Таблица 2. Изменение кратности экспрессии генов регуляции клеточной защиты от окислительного стресса и генов, связанных глутатион-S-трансферазой после однократного воздействия ТХМ в дозах от 0,125 до 4,0 г/ кг м.т.

Table 2. Changes in the expression levels of genes regulating cellular defense against oxidative stress and genes associated with glutathione S-transferase following a single administration of CCl₄ at doses ranging from 0.125 to 4.0 g/kg body weight.

| Доза ТХМ, г/ кг м.т. | Уровень экспрессии | | | |
|-------------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------|
| | <i>GSTT</i> | <i>Gclc</i> | <i>Hmox</i> | <i>Nf2l2</i> |
| 0 | -0,39±0,45 | -0,23±0,36 | -0,06±0,18 | 1,00±0,18 |
| 0,125 | 0,41±0,42 | -0,71±0,29 | 0,08±0,18* | 0,42±0,05* |
| 0,25 | 1,29±0,35 * | 0,13±0,35 | 1,03±0,34* | 0,40±0,05* |
| 0,5 | 1,67±0,14 * | 0,00±0,39 | 0,81±0,20 | 0,54±0,06 |
| 1,0 | 1,25±0,54 | -0,24±0,35 | 1,06±0,58 | 0,39±0,09* |
| 2,0 | 1,55±0,24 * | 0,18±0,30 | 1,37±0,26* | 0,52±0,06 |
| 4,0 | 0,66±0,30 | -0,75±0,31 | 1,10±0,22* | 0,50±0,15 |

Примечание: Символом «*» обозначено отличие от соответствующей величины в контрольной группе, $p < 0,05$.

Экспрессия *Ripk* не достигала значимых изменений по сравнению с контрольной группой при дозах 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,101$) и 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,182$). При дозе 0,5 г/кг м.т. была зафиксирована значительная индукция экспрессии ($p = 0,005$). Повышение дозы до 1,0 г/кг м.т. вызвало снижение экспрессии, которое не достигло статистической значимости ($p = 0,348$). Значительное подавление экспрессии *Ripk* наблюдалось при дозах 2,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$) и 4,0 г/кг м.т. ($p = 0,019$). Уровень экспрессии гена *Casp7* значительно снижался при воздействии ТХМ. В дозах 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,001$) и 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,000$) наблюдалось статистически значимое уменьшение экспрессии по сравнению с контрольной группой. Доза 0,5 г/кг м.т. также вызвала снижение экспрессии этого гена ($p = 0,011$). Максимальное подавление экспрессии зарегистрировано при дозе 1,0 г/кг

м.т. ($p = 0,000$). Дозы 2,0 г/кг м.т. ($p = 0,035$) и 4,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$) продолжили тенденцию к снижению экспрессии.

Таблица 3. Изменение кратности экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла и генов, участвующих в инициации и реализации апоптотических процессов после однократного воздействия ТХМ в дозах от 0,125 до 4,0 г/ кг м.т.

Table 3. Changes in the expression levels of cell cycle regulatory genes and genes involved in the initiation and execution of apoptotic processes following a single administration of CCl₄ at doses ranging from 0.125 to 4.0 g/kg body weight.

| Доза ТХМ, г/ кг м.т. | Уровень экспрессии | | | |
|-------------------------|--------------------|---------------|-------------|--------------|
| | <i>Cdkn</i> | <i>Check1</i> | <i>Ripk</i> | <i>Casp7</i> |
| 0 | -0,28±0,35 | -0,14±0,26 | -0,03±0,13 | -0,13±0,25 |
| 0,125 | 2,11±0,12 * | -0,74±0,49 | 0,56±0,29 | -1,32±0,17* |
| 0,25 | 2,40±0,16 * | 0,21±0,44 | 0,62±0,40 | -1,38±0,16* |
| 0,5 | 3,16±0,32 * | 0,23±0,47 | 0,86±0,26* | -0,94±0,14* |
| 1,0 | 2,69±0,73 * | 1,03±0,61 | 0,41±0,36 | -1,84±0,22* |
| 2,0 | 2,30±0,79 * | 1,26±0,54 | -1,85±0,42* | -0,87±0,18* |
| 4,0 | 2,36±0,73 * | 0,88±0,59 | -0,86±0,30* | -1,56±0,13* |

Примечание: Символом «*» обозначено отличие от соответствующей величины в контрольной группе, $p < 0,05$.

Экспрессия гена *Htop1* оставалась на уровне контроля при дозе 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,766$), но значительно возросла при 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,014$) и 0,5 г/кг м.т. ($p = 0,005$). Доза 1,0 г/кг м.т. вызвала дальнейшее увеличение, но не достигла статистической значимости ($p = 0,154$). При дозах 2,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$) и 4,0 г/кг м.т. ($p = 0,000$) наблюдался значительный рост экспрессии. Экспрессия гена *Nf2l2* значительно снизилась в группах, получавших 0,125 г/кг м.т. ($p = 0,018$), 0,25 г/кг м.т. ($p = 0,029$) и 1,0 г/кг м.т. ($p = 0,014$), но не достигла статистической значимости при дозах 0,5 г/кг м.т. ($p = 0,063$), 2,0 г/кг м.т. ($p = 0,061$) и 4,0 г/кг м.т. ($p = 0,125$).

Обсуждение. Изменения биохимических параметров при токсическом поражении печени тесно связаны с экспрессией генов, регулирующих систему глутатиона и ответа на окислительный стресс [19,20]. Этот процесс начинается с преобразования ТХМ до его активных метаболитов, которые, взаимодействуя с молекулами кислорода, приводят к образованию активных форм кислорода (АФК) [4,6,8]. АФК, в свою очередь, вызывают окислительное повреждение липидов

клеточных мембран, белков и ДНК [21]. Глутатион, являясь основным клеточным антиоксидантом, требуется в увеличенных количествах для нейтрализации АФК, что приводит к его истощению и активации генов, ответственных за его синтез [22,23]. Повышение экспрессии генов антиоксидантной системы может способствовать восстановлению клеток. Однако в случаях, когда антиоксидантная система не справляется с нагрузкой, происходит утечка внутриклеточных ферментов в кровотоки, что проявляется увеличением биохимических маркеров повреждения гепатоцитов в крови и может свидетельствовать о прогрессировании повреждения печени [24]. В случае значительного повреждения гепатоцитов активируются гены, регулирующие остановку клеточного цикла и апоптоз [25,26].

Повреждение гепатоцитов является одним из факторов, приводящих к утечке внутриклеточных ферментов в кровь [24]. Как видно из данных, приведенных в таблице 1, в нашем исследовании наблюдалось выраженное увеличение активности ферментов АсАТ и АлАТ при высоких дозах ТХМ, но не ЛДГ или ЩФ. АлАТ и АсАТ являются внутриклеточными ферментами, участвующим в метаболизме аминокислот и энергетическом обмене клетки, и при нормальном функционировании клеток находятся внутри них [27,28]. Вероятно, такое увеличение активности ферментов при высоких дозах ТХМ указывает на прогрессирующее повреждение печени при увеличении дозы токсиканта. Увеличение продукции ЛДГ связывают со сниженной оксигенацией, что делает этот фермент важным диагностическим маркером гипоксических состояний печени [29]. ТХМ, исходя из патогенетических механизмов его действия на клетку [4, 6, 8], также способен вызывать гипоксию – за счет нарушения свободными радикалами целостности клеточных и митохондриальных мембран, что может быть причиной нарушения клеточного дыхания и развития гипоксии. При дальнейшем развитии интоксикации гипоксия может быть связана с нарушением микроциркуляции органа и накоплением токсических метаболитов. Отсутствие статистически значимого повышения активности ЛДГ в настоящем исследовании при однозначной тенденции к росту данного показателя может быть связано с высокими компенсаторными возможностями печени, которые позволяют поддерживать нормальный уровень фермента на ранних этапах интоксикации. Известно, что уровень ЛДГ может достигать пиковых значений только через 24-48 часов после патологического события [30]. Активность ЩФ продемонстрировала статистически значимое увеличение в группе, получавшей ТХМ в дозе 1,0 г/кг м.т. В группах с более высокой дозировкой ТХМ (2,0 и 4,0 г/кг м.т.) была отмечена

тенденция к повышению данного показателя, однако статистически значимых различий по сравнению с контрольной группой не наблюдалось. ЩФ – связанный с плазматической мембраной металлофермент, чье повышение может говорить о повреждении клеток печени [31].

Изменение биохимических показателей коррелирует с динамикой экспрессии изучаемых генов (таблица 2,3). Так, мы наблюдаем значительное увеличение экспрессии *Hmx1*, который не только служит чувствительным и надежным маркером клеточного окислительного стресса, но и выполняет важную роль в адаптивной защите клеток от окислительного повреждения [10], начиная с минимальной дозы ТХМ. Аналогично изменяется уровень экспрессии *Nf2l2*, который активирует гены, кодирующие антиоксидантные ферменты и белки, участвующие в детоксикации [9]. Увеличивается уровень экспрессии *GSTT*, который является частью защитного механизма организма, направленного на усиление антиоксидантной защиты и детоксикации [12-14]. Вместе с тем, не было зафиксировано увеличение экспрессии *Gclc*, кодирующего каталитическую субъединицу глутаматцистеиновой лигазы, ключевого фермента в синтезе глутатиона [11]. Вероятно, это связано с тем, что *Gclc* является элементом, катализирующим начальный этап биосинтеза глутатиона [32], и однократного наблюдения через 24 часа после воздействия, возможно, недостаточно для выявления значительного увеличения его экспрессии.

Исходя из результатов, полученных при оценке уровня экспрессии *Check1* и семейства *Cdkn*, мы можем предположить, что клеточный цикл при воздействии ТХМ останавливается в фазах G1 или G2 [15], но не при переходе из фазы G2 в M [16]. Предположительно, усиление экспрессии *Cdkn* с пиком активности при средней дозировке и последующим снижением на более высоких дозах связано с реакцией клетки на повреждение ДНК, что и служит молекулярной основой для остановки клеточного цикла [33]. Отметим, что было зафиксировано во всех опытных группах не только увеличение экспрессии гена *Cdkn*, ответственного за остановку клеточного цикла, но и *Casp7*. Известно, что каспазы не только являются одним из «ключевых исполнителей» в механизме клеточной смерти [18], но и важны в первые 24 часа после повреждения клетки для нормального течения регенеративных процессов [34]. Предположительно, наблюдаемая регенерация указывает на активацию компенсаторных механизмов клеточной защиты, направленными на ограничение повреждения и восстановление гомеостаза. Это суждение дополняет экспрессия гена *Ripk*, которая при интоксикации ТХМ демонстрирует дозозависимый характер: низкие дозы приводят к умеренному

увеличению экспрессии, направленному на защиту клеток и регуляцию воспаления, тогда как при воздействии высоких доз экспрессия значительно возрастает [17], что коррелирует с усилением некротического и воспалительного повреждения тканей.

Заключение. Воздействие тетрахлорметана даже на низком уровне доз (от 0,125 г/кг м.т.) вызывает активацию экспрессии генов, отвечающих за остановку клеточного цикла, активацию систем антиоксидантной защиты и репаративных механизмов в тканях печени. Повышение уровня экспрессии генов антиоксидантной системы может способствовать восстановлению клеток и сохранению высоких компенсаторных возможностей печени, которые позволяют поддерживать нормальный уровень фермента на ранних этапах интоксикации. При высоких дозах токсиканта (1,0, 2,0 и 4,0 г/кг м.т.) этот наблюдаемый нами эффект может снижаться из-за метаболической депрессии в клетках печени, в конечном итоге приводящее к их гибели. Также при этом наблюдается повышение активности ферментов в сыворотки крови, указывающее на повреждения тканей печени.

Полученные данные говорят о возможности использования показателей экспрессии изученных генов в качестве маркеров токсического повреждения печени низкими дозами токсикантов. Результаты настоящего исследования могут стать основой для более чувствительных и специфичных методов диагностики токсического гепатита. Использование молекулярных маркеров в сочетании с традиционными биохимическими анализами может улучшить мониторинг состояния печени у работников, подвергающихся риску воздействия токсичных веществ, и способствовать своевременному выявлению патологии.

Список литературы:

1-18, 20-34 см. References

19. Каримов Д. О., Кутлина Т.Г., Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Репина Э.Ф., Хуснутдинова Н.Ю. Изменение профиля экспрессии генов адаптивного ответа при токсических гепатитах различной этиологии. Гигиена и санитария. 2019; 98(9): 1021-1025. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2019-98-9-1021-1025>

References:

1. Malaguarnera G., Cataudella E., Giordano M., Nunnari G., Chisari G., Malaguarnera M. Toxic hepatitis in occupational exposure to solvents. World J Gastroenterol. 2012;18(22):2756-66. doi: 10.3748/wjg.v18.i22.2756.

2. European Association for the Study of the Liver. Clinical Practice Guideline Panel: EASL Clinical Practice Guideline: Occupational liver diseases. *J Hepatol.* 2019;71(5):1022-1037. doi: 10.1016/j.jhep.2019.08.008.
3. Choe H.J., Ahn S., Jung K., Kim J.W. Acute liver failure caused by occupational exposure to HCFC-123: Two case reports. *Medicine (Baltimore).* 2019; 98(9): e14522. doi: 10.1097/MD.00000000000014522.
4. Slater T.F., Cheeseman K.H., Ingold K.U. Carbon tetrachloride toxicity as a model for studying free-radical mediated liver injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1985; 311(1152): 633-45. doi: 10.1098/rstb.1985.0169
5. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 5943, Carbon Tetrachloride. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbon-Tetrachloride> (to 20.08.2024)
6. Unsal V., Cicek M., Sabancilar İ. Toxicity of carbon tetrachloride, free radicals and role of antioxidants. *Rev Environ Health.* 2020; 36(2): 279-295. doi: 10.1515/reveh-2020-0048.
7. LeFort K.R., Rungratanawanich W., Song B.J. Contributing roles of mitochondrial dysfunction and hepatocyte apoptosis in liver diseases through oxidative stress, post-translational modifications, inflammation, and intestinal barrier dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* 2024; 81: 34. doi: 10.1007/s00018-023-05061-7.
8. Balogun F.O., Ashafa A.O.T. Antioxidant, hepatoprotective and ameliorative potentials of aqueous leaf extract of *Gazania krebsiana* (Less.) against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in Wistar rats. *Trans R Soc S Afr.* 2016; 71:145–156.
9. Ngo V., Duennwald M.L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(12):2345. doi: 10.3390/antiox11122345.
10. Poss K.D., Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(20):10925-30. doi: 10.1073/pnas.94.20.10925.
11. Mohar I., Botta D., White C.C., McConnachie L.A., Kavanagh T.J. Glutamate cysteine ligase (GCL) transgenic and gene-targeted mice for controlling glutathione synthesis. *Curr Protoc Toxicol.* 2009; 6(16): 16. doi: 10.1002/0471140856.tx0616s39
12. Nebert D.W., Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics.* 2004; 1, 460. doi: 10.1186/1479-7364-1-6-460
13. Bolt H.M., Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology. *Curr Drug Metab.* 2006;7(6):613-28. doi: 10.2174/138920006778017786
14. Thorn C.F., Ji Y., Weinshilboum R.M., Altman R.B., Klein T.E. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for GSTT1. *Pharmacogenet Genomics.* 2012; 22(8):646-51. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283527c02.
15. Soto J.L., Cabrera C.M., Serrano S., López-Nevot M.A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer.* 2005; 5: 36. doi: 10.1186/1471-2407-5-36.
16. Chung I., Leonhardt H., Rippe K. De novo assembly of a PML nuclear subcompartment occurs through multiple pathways and induces telomere elongation. *J Cell Sci.* 2011; 124(Pt 21): 3603-18. doi: 10.1242/jcs.084681
17. Cuny G.D., Degterev A. RIPK protein kinase family: Atypical lives of typical kinases. *Semin Cell Dev Biol.* 2021; 109: 96-105. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.06.014.
18. McIlwain D.R., Berger T., Mak T.W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5(4): a008656. doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
19. Karimov D.O., Kutlina T.G., Mukhammadiyeva G.F., Valova Y.V., Repina E.F., Khusnutdinova N.Yu. Change of the profile of expression of adaptive response genes in toxic hepatitis of different

- etiology. *Hygiene and Sanitation*. 2019;98(9):1021-1025. (In Russ.) <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2019-98-9-1021-1025>
20. Arauz J., Ramos-Tovar E., Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol*. 2016;15(2):160-73. doi: 10.5604/16652681.1193701.
 21. Checa J., Aran J.M. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res*. 2020; 13: 1057-1073. doi: 10.2147/JIR.S275595.
 22. Averill-Bates D.A. The antioxidant glutathione. *Vitam Horm*. 2023; 121: 109-141. doi: 10.1016/bs.vh.2022.09.002.
 23. Garama D.J., Harris T.J., White C.L., Rossello F.J., Abdul-Hay M., Gough D.J., Levy D.E. A synthetic lethal interaction between glutathione synthesis and mitochondrial reactive oxygen species provides a tumor-specific vulnerability dependent on STAT3. *Mol Cell Biol*. 2015; 35(21):3646-56. doi: 10.1128/MCB.00541-15.
 24. Contreras-Zentella M.L., Hernández-Muñoz R. Is liver enzyme release really associated with cell necrosis induced by oxidant stress? *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:3529149. doi: 10.1155/2016/3529149.
 25. Yedjou C.G., Tchounwou H.M., Tchounwou P.B. DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis induction caused by lead in human leukemia cells. *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 13(1):ijerph13010056. doi: 10.3390/ijerph13010056.
 26. Ramadan W., Saleh E.M., Menon V., Vazhappilly C.G., Abdu-Allah H.H.M, El-Shorbagi A.A., Mansour W., El-Awady R. Induction of DNA damage, apoptosis and cell cycle perturbation mediate cytotoxic activity of new 5-aminosalicylate-4-thiazolinone hybrid derivatives. *Biomed Pharmacother*. 2020; 131:110571. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110571.
 27. Moriles K.E., Zubair M., Azer S.A. Alanine Aminotransferase (ALT) Test. *StatPearls*. 2024. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32644704/>
 28. Vroon D.H., Israili Z. Aminotransferases. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 99. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425/>
 29. Kotoh K., Kato M., Kohjima M., Tanaka M., Miyazaki M., Nakamura K., Enjoji M., Nakamuta M., Takayanagi R. Lactate dehydrogenase production in hepatocytes is increased at an early stage of acute liver failure. *Exp Ther Med*. 2011;2(2):195-199. doi: 10.3892/etm.2011.197
 30. Farhana A., Lappin S.L. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/\(to 24.08.2024\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557536/(to%2024.08.2024))
 31. Sharma U., Pal D., Prasad R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian J Clin Biochem*. 2014; 29(3):269-78. doi: 10.1007/s12291-013-0408-y.
 32. Mendiola A.S., Ryu J.K., Bardehle S., Meyer-Franke A., Ang K.K., Wilson C., Baeten K.M., Hanspers K., Merlini M., Thomas S., Petersen M.A., Williams A., Thomas R., Rafalski V.A., Meza-Acevedo R., Tognatta R., Yan Z., Pfaff S.J., Machado M.R., Bedard C., Rios Coronado P.E., Jiang X., Wang J., Pleiss M.A., Green A.J., Zamvil S.S., Pico A.R., Bruneau B.G., Arkin M.R., Akassoglou K. Transcriptional profiling and therapeutic targeting of oxidative stress in neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2020; 21(9): 1135. doi: 10.1038/s41590-020-0754-x
 33. Gire V., Dulic V. Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*. 2015;14(3):297-304. doi: 10.1080/15384101.2014.1000134.
 34. Bergmann A., Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration. *Sci Signal*. 2010; 3(145):re8. doi: 10.1126/scisignal.3145re8.

Поступила/Received: 02.09.2024

Принята в печать/Accepted: 23.09.2024