

УДК: 577.215.3

## АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *GCLC* И *GSTT* ПРИ ОСТРОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ У КРЫС

Валова Я.В.<sup>1,2</sup>, Кутлина Т.Г.<sup>1</sup>, Мухаммадиева Г.Ф.<sup>1</sup>, Каримов Д.О.<sup>1</sup>, Хуснутдинова Н.Ю.<sup>1</sup>,  
Байгильдин С.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», Уфа, Россия

*Цель работы заключалась в оценке уровня экспрессии генов ферментов антиоксидантной системы при индуцированном токсическом гепатите у крыс. Токсический гепатит вызывали путем подкожного введения CCl<sub>4</sub> в различных дозах. Эксперимент проводился в 2 повторностях, спустя 24 и 72 часа после затравки. В 72-часовом эксперименте было зарегистрировано достоверное снижение экспрессии гена *Gclc*, в зависимости от дозы введенного гепатотоксина.*

**Ключевые слова:** острый токсический гепатит, экспрессия генов, тетрахлорметан, глутамат цистеин лигаза, глутатион-S-трансферазы.

**Для цитирования:** Валова Я.В., Кутлина Т.Г., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю., Байгильдин С.С. Анализ экспрессии генов *GCLC* и *GSTT* при остром токсическом гепатите у крыс. Медицина труда и экология человека. 2019;2:75-79.

DOI:<http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10025>

## ANALYSIS OF EXPRESSION OF *GCLC* AND *GSTT* GENES AT ACUTE TOXIC HEPATITIS IN RATS

Valova YA.V.<sup>1,2</sup>, Karimov D.O.<sup>1</sup>, Kutlina T.G.<sup>1</sup>, Mukhammadiyeva G.F.<sup>1</sup>, Khusnutdinova N.YU.<sup>1</sup>,  
Baigildin S.S.<sup>1</sup>

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

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

*The aim of the work was to estimate the level of gene expression of antioxidant enzymes in induced toxic hepatitis in rats. Toxic hepatitis was caused by subcutaneous administration of CCl<sub>4</sub> in various doses. The experiment was conducted in 2 replications, after 24 and 72 hours after priming. In the 72-hour experiment, a significant decrease in the expression of the *Gclc* gene was recorded, depending on the dose of hepatotoxin administered.*

**Keywords:** acute toxic hepatitis, gene expression, carbon tetrachloride, glutamate cysteine ligase, glutathione-S-transferase.

**For quotation:** Valova YA.V., Karimov D.O., Kutlina T.G., Mukhammadiyeva G.F., Khusnutdinova N.YU., Baigildin S.S. Analysis of expression of *GCLC* and *GSTT* genes at acute toxic hepatitis in rats. Occupational health and human ecology.2019;2:75-79.

DOI:<http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10025>

Токсические поражения печени различной этиологии в настоящее время являются одной из важных проблем здравоохранения во всем мире ввиду широкой распространенности и существенных расходов на оказание медицинской помощи больным.

Понятие «токсические поражения печени» охватывает большую группу заболеваний, связанных с гепатотоксическим действием различных веществ (лекарственные средства,

промышленные яды, алкоголь), вызывающих патологические изменения в печени и ведущих к нарушениям функции органа [1].

Несмотря на успехи современной медицины в попытках описать общие механизмы развития токсического поражения печени, до сих пор остаются малоизученными вопросы о том, как различаются эти механизмы в зависимости от типа гепатотоксина, его дозы, а также о длительности его поступления в организм. В связи с этим токсический эффект различных ксенобиотиков непредсказуем и представляет большую проблему для клиницистов [6].

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 ЭПС гепатоцитов [3]. 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 [4].

В норме такие молекулы нейтрализуются антиоксидантной системой, состоящей из различных ферментов и низкомолекулярных соединений. Одним из важнейших внутриклеточных низкомолекулярных антиоксидантов является глутатион. Наличие достаточной концентрации восстановленного глутатиона является критическим фактором выживания клеток в условиях оксидативного стресса, поэтому чрезвычайно важным является изучение активности гена *Gclc*, белковый продукт которого участвует в первом этапе биосинтеза глутатиона [2].

Реакция конъюгации различных ксенобиотиков с восстановленным глутатионом катализируется ферментами глутатион-S-трансферазами. Каталитическая активность GST обеспечивает прямую регенерацию липоперекисей в мембранах, без предварительного фосфолипазного гидролиза, снижая последствия окислительного стресса и эндогенной интоксикации [5]. Сочетание антиоксидантных свойств и способности активировать транскрипцию генов, в том числе некоторых антиоксидантных ферментов, а также ингибировать редокс-зависимые пути активации апоптоза свидетельствует о важном вкладе GST в антиоксидантную защитную систему, что повышает устойчивость клеток к окислительному стрессу [8].

Таким образом, токсические поражения печени представляют важную проблему современной медицины, в связи с чем возникает необходимость в дальнейшем изучении этиологии, патогенеза, диагностики, лечения и профилактики данной группы заболеваний.

**Цель** исследования заключалась в оценке уровня экспрессии генов *Gclc* и *Gstt* у крыс с индуцированным острым токсическим гепатитом при различных дозах и времени затравки ТХМ.

### **Материалы и методы.**

Моделирование острого токсического гепатита у белых беспородных крыс-самцов проводили путем подкожного введения 50%-ного масляного раствора ТХМ (тетрахлорметан) из расчета 0,125-4 г/кг массы тела, однократно. Всего в опытах использовано 84 крысы (12 крыс в контрольной группе и 72 — в экспериментальной) с массой 170–190 г. Животные экспериментальной группы были разделены на шесть подгрупп в зависимости от дозы введенного гепатотоксина (0,125 г/кг; 0,25 г/кг; 0,5 г/кг; 1 г/кг; 2 г/кг; 4 г/кг соответственно). Животным контрольной группы подкожно вводили оливковое масло. Условия содержания и кормления были одинаковы для всех групп животных. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с базисными нормативными документами — рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей [9]. Печень декапитированных крыс подвергали исследованию 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 состоя-

ния 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 в норме и при ХТГ 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 было проанализировано изменение экспрессии генов *Gclc* и *Gstt* в ответ на ТХМ-индуцированный окислительный стресс. В эксперименте, длившемся 24 часа, достоверных различий уровня экспрессии гена *Gclc* между экспериментальными группами и группой контроля не обнаружено ( $p > 0,05$ ) (график 1).

Небольшое снижение уровня мРНК отмечалось лишь в группах с минимальной и максимальной дозой ТХМ (в -1,5 и -1,6 раза соответственно). Однако спустя 72 часа после затравки ТХМ были зарегистрированы значительные изменения активности гена *Gclc*. При повышении дозы от 0,125 до 4 г/кг отмечается закономерное снижение кратности экспрессии гена. При этом минимальное значение экспрессии (в 14,4 раза ниже исходного) наблюдается при максимальной дозе гепатотоксина 4 г/кг ( $F=15,6, p=0,001$ ).

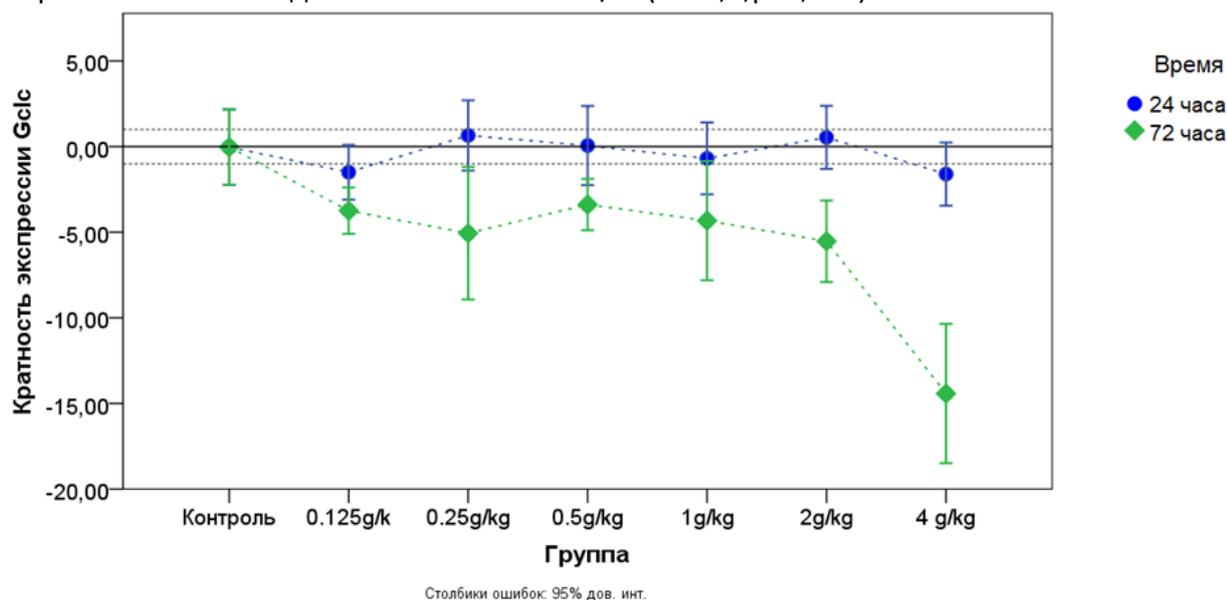


График 1. Кратность экспрессии гена *Gclc* при 24- и 72-часовых воздействиях различных доз ТХМ

Анализ экспрессии гена *Gstt* при 24-часовом эксперименте не показал достоверных различий уровня экспрессии между экспериментальными группами и группой контроля (график 2).

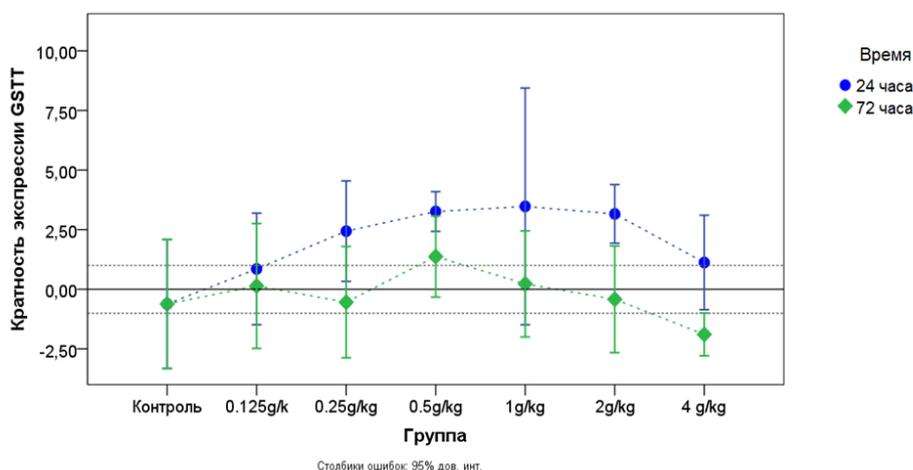


График 2. Кратность экспрессии гена *Gstt* при 24- и 72-часовых воздействиях различных доз ТХМ

При повышении дозы ТХМ от 0,125 до 1 г/кг наблюдалось плавное увеличение кратности экспрессии с максимальным ее значением при дозе 1 г/кг (3,47;  $F=2,28$ ;  $p=0,06$ ). В дальнейшем прослеживалось незначительное снижение экспрессии с 3,47 при дозе 1 г/кг до 1,12 при 4 г/кг.

Кратность экспрессии гена *Gstt* при 72-часовом эксперименте характеризуется незначительными изменениями в диапазоне от -1,90 до 1,37. Однако отмеченные различия не достигли уровня статистической значимости ( $p>0,05$ ).

Известно, что свободные радикалы, образующиеся при метаболизме ТХМ в большом количестве, активируют процессы перекисного окисления, тем самым приводя к декомпенсации АОС [7]. Такие нарушения проявляются, прежде всего, в снижении концентрации основных антиокислительных ферментов, таких как каталаза, глутатионпероксидаза и др., а также внутрипеченочной концентрации глутатиона [10].

В нашем исследовании уровень экспрессии гена *GCLC* через 24 часа после введения ТХМ значимо не отличался между исследуемыми группами и относительно контроля, что, вероятнее всего, связано с тем, что детоксикация ТХМ на данной стадии осуществляется в основном ферментативным звеном антиоксидантной системы и требует активации системы GSH. Однако спустя 3 суток после затравки ТХМ нами были получены данные о достоверном снижении уровня экспрессии гена *Gclc*, что может свидетельствовать о прогрессирующих деструктивных процессах, протекающих в печени, и истощении системы GSH.

При изучении кратности экспрессии *Gstt* в печени крыс мы наблюдали тенденцию к повышению экспрессии в зависимости от дозы, что, скорее всего, было обусловлено повышением концентрации свободных радикалов, которые, в свою очередь, приводят к фосфорилированию NRF2. После этого он соединяется с промотором *Gstt* и активирует его экспрессию, которая необходима для детоксикации и метаболизма ксенобиотиков [10]. Интересно отметить, что максимум этой экспрессии наблюдается при дозах 1 и 2 г/кг, тогда как при увеличении дозы до 4 г/кг экспрессия данного гена не повышается, что мы связываем с метаболической депрессией в гепатоцитах, которая обусловлена декомпенсацией АОС, вследствие чего гепатоциты теряют свою синтетическую функцию и не могут синтезировать глутатион-трансферазы.

Экспериментально нами показано, что активность генов *Gclc* и *Gstt* изменяется в зависимости от продолжительности эксперимента и дозы введенного гепатотоксина.

#### Список литературы:

1. Антоненко О.М. Токсические поражения печени: пути фармакологической коррекции. Медицинский совет. 2013; №.6.

2. Бабак О.Я. Глутатион в норме и при патологии: биологическая роль и возможности клинического применения. Здоровья України. 2015; №.1:1-3.
3. Голиков С.Н., Саночкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. АМН СССР. Л.: Медицина; 1986.
4. Кравченко Л.В., Трусов Н.В., Ускова М.А. и др. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса. Токсикологический вестник. 2009; № 1:12-18.
5. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы. Биомедицинская химия. 2009; 55(3): 255-277.
6. Пентюк А.А., Мороз Л.В., Паламарчук О.В. Поражения печени ксенобиотиками. Совр. проб. токс. 2001; №.1:8.
7. Altomare E., Vendemiale G., Albano O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and non alcoholic liver diseases . Life sciences. 1988; 43(12): 991-998.
8. Board P. G., Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2013; 1830(5): 3267-3288.
9. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, 18.03.1986.
10. Mahmoodzadeh Y., Mazani M., Rezagholizadeh L. Hepatoprotective Effect of Methanolic Tanacetum Parthenium Extract on CCl4-Induced Liver Damage in Rats . Toxicology Reports. 2017.

#### References:

1. Antonenko O. M. Toxic liver lesions: ways of pharmacological correction. Medical Council. 2013; №. 6.
2. Babak O.Ya. Glutathione in health and disease: the biological role and possibilities of clinical use. Ukrainian Health. 2015; № 1: 1-3.
3. Golikov S.N., Sanotskiy I.V., Tiunov L.A. General mechanisms of toxic action. USSR Academy of Medical Sciences. L .: Medicine, 1986.
4. Kravchenko L.V., Trusov N.V., Uskova M.A., et al. Characterization of the acute toxic effect of carbon tetrachloride as a model of oxidative stress. Toxicological Vestnik. 2009; №. 1: 12-18.
5. Kulinskiy V.I., Kolesnichenko L.S. System of glutathione. I. Synthesis, transport, glutathione transferase, glutathione peroxidase. Biomedical chemistry. 2009; 55 (3): 255-277.
6. Pentiuk A. A., Frost L. V., Palamarchuk O. V. Liver lesions with xenobiotics. Modern prob. of toxic. 2001; №. 18
7. Altomare E., Vendemiale G., Albano O. Hepatic glutathione content in patients with alcoholic and nonalcoholic liver diseases. Life sciences. 1988; 43 (12): 991-998.
8. Board P. G., Menon D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. Biochemical and Biophysical Acta (BBA) - General Subjects. 2013; 1830 (5): 3267-3288.
9. Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes, 03/18/1986
10. Mahmoodzadeh Y., Mazani M., Rezagholizadeh L. Hepatoprotective Effect of Methanolic Tanacetum Parthenium Extract on CCl4-Induced Liver Damage in Rats. Toxicology Reports. 2017.

Поступила/Received:12.02.2019

Принята в печать/Accepted: 26.02.2019