

УДК: 577.215.3

ОЦЕНКА ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНА HMOX1 ПРИ АЛКОГОЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС И ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ КОРРЕКЦИИ

Валова Я.В.^{1,2}, Зиятдинова М.М.¹, Мухаммадиева Г.Ф.¹, Фазлыева А.С.¹, Каримов Д.О.¹, Хуснутдинова Н.Ю.¹, Якупова Т.Г.¹, Смолянкин Д.А.¹

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

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

В настоящее время злоупотребление алкоголем является основной причиной смертности среди людей трудоспособного возраста, а общие расходы на лечение и реабилитацию больных составляют миллиарды долларов. В связи с этим поиск эффективной терапии алкогольных поражений печени представляет собой актуальную задачу для современной гепатологии. Цель работы заключалась в оценке уровня экспрессии гена Hmx1 у крыс с индуцированным алкогольным поражением печени до и после применения гепатопротекторных препаратов (Гептор, Мексидол и Оксиметилурацил). Анализ экспрессии генов в печени крыс проводили методом ПЦР в режиме реального времени. В результате проведенного эксперимента было показано, что спустя 24 часа после введения этанола во всех экспериментальных группах отмечалось значительное снижение уровня мРНК относительно отрицательного контроля. Однако различий в уровне экспрессии гена в группе без лечения и группах с лечением обнаружено не было.

Ключевые слова: алкогольное поражение печени, экспрессия генов, гемоксигеназа-1, гептор, мексидол, оксиметилурацил.

Для цитирования: Валова Я.В., Зиятдинова М.М., Мухаммадиева Г.Ф., Фазлыева А.С., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю., Якупова Т.Г., Смолянкин Д.А. Оценка транскрипционной активности гена HMOX1 при алкогольном поражении печени у крыс и последующей лекарственной коррекции. Медицина труда и экология человека. 2021: 1:102-107

Для корреспонденции: Валова Яна Валерьевна, м.н.с. отдела токсикологии и генетики ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Q.juk@yandex.ru.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10110>

ASSESSMENT OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE HMOX1 GENE IN ALCOHOLIC LIVER INJURY IN RATS AND SUBSEQUENT DRUG CORRECTION

Valova Y.V.^{1,2}, Ziatdinova M.M.¹, Mukhammadiyeva G.F.¹, Fazlyeva A.S.¹, Karimov D.O.¹, Khusnutdinova N.Yu.¹, Yakupova T.G.¹, Smolyankin D.A.¹

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

2-Bashkir State University, Ufa, Russia

Alcohol abuse is currently the leading cause of death among people of working age, and the total cost of treatment and rehabilitation for patients is billions of dollars. In this regard, the search

for an effective therapy for alcoholic liver damage is an urgent problem for hepatology. The aim of the work was to assess the level of Hmx1 gene expression in rats with alcohol-induced liver damage before and after the use of hepatoprotective drugs (heptor, mexidol, and oxymethyluracil). Analysis of gene expression in rat liver was performed by real-time PCR. As a result of the experiment, it was shown that 24 hours after the introduction of ethanol in all experimental groups there was a significant decrease in the level of mRNA relative to the negative control. However, no differences were found in the level of gene expression between the untreated and treated groups.

Key words: alcoholic liver damage, gene expression, heme oxygenase-1, heptor, mexidol, oxymethyluracil

Citation: Valova Ya.V., Ziatdinova M.M., Mukhammadieva G.F., Fazlyeva A.S., Karimov D.O., Khusnutdinova N.Yu., Yakupova T.G., Smolyankin D. A. Evaluation of the transcriptional activity of the HMOX1 gene in alcoholic liver damage in rats and subsequent drug correction. *Occupational health and human ecology*. 2021: 1:102-107

Correspondence: Yana V. Valova, Junior researcher, Department of Toxicology and Genetics, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Q.juk@yandex.ru.

Financing: The study had no financial support.

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

DOI: <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2021-10110>

Актуальность. Согласно статистическим исследованиям, каждый второй россиянин старше 18 лет имеет проблемы с алкоголем [1]. При этом алкогольная болезнь печени развивается у 60-100% лиц, злоупотребляющих алкоголем и практически у каждого больного, страдающего алкоголизмом [2]. Алкогольная болезнь печени (АБП) – это группа клинико-морфологических вариантов повреждения печени, обусловленных длительным приемом токсических доз этанола. АБП охватывает спектр заболеваний, начиная от жировой дистрофии печени (стеатоз), иногда прогрессируя до алкогольного гепатита и заканчивая циррозом печени, который является наиболее распространенной и необратимой формой поражения печени, связанной с употреблением алкоголя [3]. При развитии цирроза печени 5-летних показателей выживаемости достигают лишь 50% пациентов. В связи с этим злоупотребление алкоголем является основной причиной смертности среди людей в возрасте 15–49 лет, а общие расходы на лечение и реабилитацию госпитализированных больных составляют миллиарды долларов [4].

Развитие алкогольного поражения печени обусловлено как прямым гепатотоксическим воздействием этанола и его метаболитов на мембраны гепатоцитов и митохондрий, так и развитием окислительного стресса в печени из-за накопления активных форм кислорода (АФК), образующихся в результате метаболизма алкоголя. Прогрессирование АБП происходит за счет развития воспалительной реакции, вызванной производством цитокинов и фактора некроза опухолей (ТНФ- α) [2].

Одним из способов снижения интенсивности окислительных процессов в организме является производство биливердина, которое осуществляют ферменты гемоксигеназной сигнальной системы за счет расщепления гема. У млекопитающих были идентифицированы две основные изоформы фермента: гемоксигеназа 1 (Hmx1) и гемоксигеназа-2 (Hmx2). Hmx2 конститутивно экспрессируется во всех тканях, чтобы справляться с непрерывным

высвобождением гема при клеточном метаболизме, тогда как *Htox1* является индуцибельным ферментом, который активируется в ответ на такие стимулы, как гипоксия и окислительный стресс [5]. Кроме участия в восстановлении окислительно-восстановительного баланса *Htox1* может проявлять цитопротективные и противовоспалительные свойства. В нескольких работах было продемонстрировано, что монооксид углерода, который является одним из продуктов гем деградации, может модулировать синтез провоспалительных или противовоспалительных цитокинов и медиаторов [6-7], а также проявлять антиапоптотические свойства [8]. Ранее было показано, что экспрессия *Htox 1* может возрастать более чем в 10 раз в печени крыс, подвергнутых воздействию различных токсикантов, включая тетрахлорметан, ацетаминофен и этанол [8-10].

Механизмы антиоксидантной активности данных ферментов точно не установлены, однако считается, что все продукты деградации гема (биливердин / билирубин, железо и СО) так или иначе участвуют в цитопротективных эффектах и способны предупреждать гиперпродукцию прооксидантов и апоптоз [11].

Целью данного исследования была оценка уровня экспрессии гена *Htox1* у крыс с индуцированным алкогольным поражением печени до и после применения гепатопротекторных препаратов (Гептор, Мексидол и Оксиметилурацил).

Материалы и методы. Моделирование острого алкогольного поражения печени проводили на самцах белых беспородных крыс массой 170-190 г путем перорального введения 40% раствора этанола из расчета 4 г/кг массы тела, однократно. Животным контрольной группы перорально вводили эквивалентный объем дистиллированной воды. Животным остальных трех групп наряду с этанолом вводили: 1) внутривенно Гептор в дозе 72 мг/кг; 2) подкожно Мексидол в дозе 50 мг/кг; 3) перорально Оксиметилурацил (ОМУ) в дозе 50 мг/кг. Спустя сутки животных умерщвляли путем декапитации с отбором образцов печени для исследования экспрессии. 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). Количественные данные обрабатывали по критерию (t) Стьюдента и с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Спустя 24 часа после введения этанола во всех экспериментальных группах было зарегистрировано статистически значимое снижение уровня мРНК гена *Htox1* относительно отрицательного контроля ($F=32,09$, $p=0,000$) (рис.). Однако различия в уровне экспрессии гена практически отсутствовали между группой положительного контроля и экспериментальными группами. Минимальное количество транскриптов наблюдалось в группе после лечения Мексидолом ($-6,42 \pm 0,67$). В группе, получавшей Гептор кратность экспрессии также оказалась ниже, чем в группе без лечения ($-6,27 \pm 0,32$). Лишь в группе, получавшей ОМУ, уровень транскриптов оказался незначительно выше, чем в группе положительного контроля, однако различия не достигли уровня статистической значимости ($-5,03 \pm 0,25$, $p > 0,05$).

Согласно литературным данным различные факторы, в том числе окислительный стресс, могут стимулировать экспрессию гена *Htox1* [5, 12]. Тогда как чрезмерная продукция АФК, которая в том числе наблюдается при остром отравлении алкоголем, напротив,

коррелировала со сниженными уровнями белка *Htox1* [13]. В нашем исследовании активность гена *Htox1* оказалась сильно снижена во всех группах, затравленных этанолом, что согласуется с результатами других авторов. Интересно отметить, что в группах, получавших в качестве гепатопротекторов Гептор и Мексидол уровень мРНК был ниже, чем в группе без лечения, и лишь в группе, получавшей ОМУ, активность гена была незначительно выше группы положительного контроля. Можно предположить, что при острой интоксикации этанолом введение препаратов по данной схеме не только не оказывает положительного эффекта, но и может выступать дополнительным стрессовым фактором.

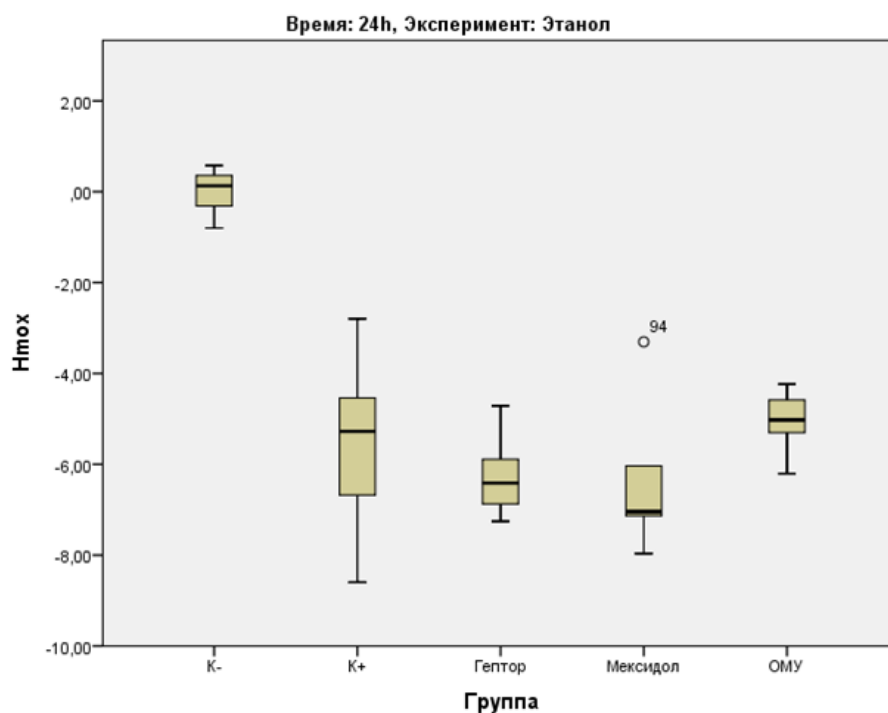


Рис. Кратность экспрессии гена *Htox1* спустя 24 часа после интоксикации этанолом и после лекарственной коррекции

Ранее в эксперименте на крысах было показано, что схема введения гепатопротекторных препаратов во многом определяют их эффективность при остром отравлении этанолом [14]. Таким образом, ни один препарат не показал значительного эффекта на транскрипционную активность гена *Htox1* на фоне интоксикации этанолом. Однако приняв во внимание то, что при применении ОМУ уровень экспрессии гена был чуть выше, чем в остальных группах, можно предположить, что клинический потенциал данного вещества при отравлениях этанолом несколько лучше, чем у других представленных препаратов.

Список литературы:

1. Тарасова Л. В. Алкогольная болезнь печени – наиболее актуальная проблема современной гепатологии. Ремедиум Приволжье. 2016;9 (149):15-20.
2. Пауков В. С., Ерохин Ю. А. Патологическая анатомия алкогольной болезни. Альманах клинической медицины. 2020;2(48).

3. Ивашкин В. Т., Маевская М. В., Павлов Ч. С., Сиволап Ю. П., Луньков В. Д., Жаркова М. С. и др. Клинические рекомендации Российского общества по изучению печени по ведению взрослых пациентов с алкогольной болезнью печени. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2017;6 (27):20-40.
4. Seitz H. K., Bataller R., Cortez-Pinto H., Gao B., Gual A., Lackner C. et al. Alcoholic liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;1(4):1-22.
5. Gozzelino R., Jeney V., Soares M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2010;50:323-354.
6. El-Achkar G. A., Mrad M. F., Mouawad C. A., Badran B., Jaffa A. A., Motterlini R. et al. Heme oxygenase-1—Dependent anti-inflammatory effects of atorvastatin in zymosan-injected subcutaneous air pouch in mice. *PLoS one*. 2019;5(14):0216405.
7. Ryter S. W., Choi A. M. K. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Translational Research*. 2016;1(167):7-34
8. Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Chmelíková E., Sedmíková M. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. *PeerJ*. 2017; 5: e3876.
9. Wen T., Guan L., Zhang Y. L., Zhao, J. Y. Dynamic changes of heme oxygenase-1 and carbon monoxide production in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Toxicology*. 2006;1(228):51-57.
10. Wei C. L., Lee K. H., Khoo H. E., Hon W. M. Expression of haem oxygenase in cirrhotic rat liver. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2003;3(199):324-334.
11. Bakhautdin B., Das D., Mandal P., Roychowdhury S., Danner J., Bush K. et al. Protective role of HO-1 and carbon monoxide in ethanol-induced hepatocyte cell death and liver injury in mice. *Journal of hepatology*. 2014;5(61):1029-1037.
12. Родионов Г. Г., Хурцилава О. Г., Плужников Н. Н., Накатис Я. А., Бакулина Л. С., Константинов Д.П. и др. Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство. СПб.: СЗГМУ им. И. И. Мечникова; 2012.
13. Drummond G. S., Baum J., Greenberg M., Lewis D., Abraham N. G. HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2019; 673:108073.
14. Гребенюк А. Н., Рейнюк В. Л., Антушевич А. Е., Халютин Д. А., Маркосян А. М. Эффективность нейропептида и гепатопротекторов пептидной и непептидной природы в терапии острых крайне тяжелых отравлений этиловым спиртом. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2014; 1: 136-141.

References:

1. Tarasova L.V. Alcoholic liver disease is the most pressing problem of modern hepatology. *Remedium Volga region*. 2016;9 (149):15-20.
2. Paukov V.S., Erokhin Yu. A. Pathological anatomy of alcoholic disease. *Almanac of Clinical Medicine*. 2020;2(48).
3. Ivashkin V.T., Mayevskaya M.V., Pavlov Ch. S., Sivolap Yu. P., Lunkov V.D., Zharkova M.S., et al. Clinical guidelines of the Russian Society for the Study of the Liver for Management of

- adult patients with alcoholic liver disease. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2017;6(27):20-40.
4. Seitz H. K., Bataller R., Cortez-Pinto H., Gao B., Gual A., Lackner C. et al. Alcoholic liver disease. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018;1(4):1-22.
 5. Gozzelino R., Jeney V., Soares M. P. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2010;50:323-354.
 6. El-Achkar G. A., Mrad M. F., Mouawad C. A., Badran B., Jaffa A. A., Motterlini R., et al. Heme oxygenase-1—Dependent anti-inflammatory effects of atorvastatin in zymosan- injected subcutaneous air pouch in mice. *PLoS one*. 2019;5(14):0216405.
 7. Ryter S. W., Choi A. M. K. Targeting heme oxygenase-1 and carbon monoxide for therapeutic modulation of inflammation. *Translational Research*. 2016;1(167):7-34
 8. Němeček D., Dvořáková M., Heroutová I., Chmelíková E., Sedmíková M. Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging. *Peer J*. 2017;5:3876.
 9. Wen T., Guan L., Zhang Y. L., Zhao, J. Y. Dynamic changes of heme oxygenase-1 and carbon monoxide production in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Toxicology*. 2006;1(228):51-57.
 10. Wei C. L., Lee K. H., Khoo H. E., Hon W. M. Expression of haem oxygenase in cirrhotic rat liver. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2003;3(199):324-334.
 11. Bakhautdin B., Das D., Mandal P., Roychowdhury S., Danner J., Bush K. et al. Protective role of HO-1 and carbon monoxide in ethanol-induced hepatocyte cell death and liver injury in mice. *Journal of hepatology*. 2014;5(61):1029-1037.
 12. Rodionov G. G., Khurtsilava O. G., Pluzhnikov N. N., Nakatis Ya. A., Bakulina L.S., Konstantinov D.P. et al. Oxidative stress and inflammation: pathogenetic partnership. St. Petersburg: the Mechnikov NWSMU; 2012.
 13. Drummond G. S., Baum J., Greenberg M., Lewis D., Abraham N. G. HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2019;673:108073.
 14. Grebenyuk A.N., Reynyuk V.L., Antushevich A.E., Khalyutin D.A., Markosyan A.M. Efficiency of neuropeptide and hepatoprotectors of peptide and non-peptide nature in the treatment of acute extremely severe poisoning with ethyl alcohol. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2014;1:136-141.

Поступила/Received: 25.02.2021

Принята в печать/Accepted: 04.03.2021