

УДК: 577.215.3

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА В ИЗУЧЕНИИ ПРОИЗВОДСТВЕННО ОБУСЛОВЛЕННЫХ ТОКСИЧЕСКИХ ГЕПАТИТОВ

Якупова Т.Г., Каримов Д.О., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф.

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

*В работе была изучена экспрессия гена глутатион-трансферазы класса M (GSTM) в гепатоцитах через 1 и 3 суток после затравки четыреххлористым углеводом в разных дозах. Уровень экспрессии GSTM повышался при малых дозах тетрахлорметана (0,125 – 1 г/кг) через 24 часа. Максимальный уровень экспрессии наблюдался при дозе 0,25 г/кг. При попадании в организм высоких доз тетрахлорметана наблюдалось истощение данного механизма детоксикации и кратность экспрессии не превышала данные показатели в группе контроля. При анализе уровня представленности транскриптов этого гена через 72 часа после затравки наблюдалась обратно пропорциональная зависимость.*

**Ключевые слова:** экспериментальный токсический гепатит, глутатион-S-трансферазы, тетрахлорметан, экспрессия

**Для цитирования:** Якупова Т.Г., Каримов Д.О., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф. Молекулярная генетика в изучении производственно обусловленных токсических гепатитов. Медицина труда и экология человека. 2019: 4:73-77.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10050>

## MOLECULAR GENETICS IN THE STUDY OF PRODUCTIVITATED TOXIC HEPATITIS

T.G. Yakupova, D.O. Karimov, YA. V. Valova, G.F. Mukhammadiyeva

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

*In the study, the expression of the class M glutathione transferase gene (GSTM) in hepatocytes was studied 1 and 3 days after inoculation with carbohydrate tetrachloride in different doses. The level of GSTM expression increased with small doses of carbon tetrachloride (0.125 - 1 g / kg), after 24 hours. The maximum expression level was observed at a dose of 0.25 g / kg. When high doses of carbon tetrachloride were ingested, depletion of this detoxification mechanism was observed and the expression rate did not exceed these indices in the control group. When analyzing the level of transcript representation of this gene 72 hours after inoculation, an inverse proportion was observed.*

**Keywords:** experimental toxic hepatitis, glutathione-S-transferase, carbon tetrachloride, expression

**For citation:** T.G. Kutlina, D.O. Karimov, YA. V. Valova, G.F. Mukhammadiyeva. Molecular genetics in the study of productivitated toxic hepatitis. Occupational Occupational health and human ecology. 2019: 4:73-77

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10050>

### Актуальность

Из-за прогрессирующего загрязнения окружающей среды и роста промышленности токсическое повреждение печени в настоящее время привлекает

особое внимание многих исследователей. Печень играет центральную роль в процессах углеводного, белкового, липидного, пигментного обмена, а также в процессах детоксикации многочисленных веществ, поступающих в организм как снаружи, так и из кишечника, в частности путем их окисления, конъюгации, декарбоксилирования [1]. Поступление посторонних веществ, обладающих токсическими свойствами, может оказать существенное влияние на печень, что приведет к ее токсическому повреждению. Развитие этого патологического состояния обусловлено несколькими группами этиологических факторов: интоксикация гепатотропными веществами (четырёххлористый углерод, бензол), лекарственными средствами (парацетамол, антидепрессанты, противовоспалительные препараты, тетрациклин и др.), этанолом и его суррогатами. Токсичные вещества приводят к развитию печеночной недостаточности, опухолей, гепатита и цирроза печени [2].

Тетрахлорметан (TCM,  $CCl_4$ , четырёххлористый углерод) является одним из наиболее хорошо изученных гепатотропных ядов. По своим физическим свойствам это бесцветная летучая жидкость, плохо растворимая в воде, имеет резкий специфический запах [8]. Четырёххлористый углерод смешивают с неполярными органическими растворителями, используют в промышленности в качестве растворителя жиров и для химической чистки одежды.  $CCl_4$  попадает в атмосферу в результате промышленных выбросов химических предприятий.

При метаболизме четырёххлористого углерода в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов под действием ферментов системы микросомального окисления, в том числе цитохрома P450, образуются свободные радикалы, окисляющие микросомальные липиды, что и обуславливает гепатотоксический эффект  $CCl_4$ . Процесс окисления липидов ведет к распаду внутриклеточных мембран митохондрий, лизосом, высвобождению активных ферментов, денатурации белков с последующей гибелью клетки [6]. В ответ на повреждение происходит активизация антиоксидантов.

Глутатион-S-трансферазы (GSTs) – семейство метаболических изоферментов эукариотической и прокариотической фазы II, они наиболее известны своей способностью катализировать конъюгирование восстановленной формы глутатиона (GSH) с ксенобиотическими субстратами для детоксикации. Семейство GST состоит из трех суперсемей: цитозольного, митохондриального и микросомального. GST являются ключевым компонентом второй фазы детоксикации ксенобиотиков. Описаны некоторые изоформы глутатион-S-трансфераз (A1, M1, P1, T1 и др.). Гены, кодирующие белки активности глутатион-S-трансферазы (GSTT, GSTP и GSTM), известные как ферменты фазы детоксикации ксенобиотиков 2 [9]. Гены GSTT, GSTM и GSTP кодируют различные типы S-трансфераз глутатиона - T1, M1 и P1. Глутатион-S-трансферазы активно участвуют в детоксикации ряда ксенобиотиков путем связывания с глутатионом и играют ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и мутациям ДНК. Экспрессия гена GST имеет тканеспецифические особенности: GSTM обнаруживается во многих тканях, включая лимфоидные органы и лимфоциты, а фермент также – в клетках печени [10].

Целью работы явилось исследование количественной экспрессии гена GSTM в печени крыс в норме и при экспериментальном токсическом гепатите (ЭТГ).

#### **Материал и методы исследования**

Токсический гепатит у белых крыс вызывали путем введения тетрахлорметана (ТХМ) в виде 50% масляного раствора в дозе 0,125-4 г/кг массы животного подкожно, однократно. Печень декапитированных крыс подвергали исследованию спустя 24 и 72 часа после затравки. Животным контрольной группы подкожно вводили оливковое масло. Всего в опытах использованы 84 белые беспородные крысы (12 крыс в контрольной группе и 72 – в экспериментальной) с массой 170–190 г. При уходе за животными, питании и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами: Рекомендациями комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздраве России, рекомендациями ВОЗ, Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей.

Кусочки печени сразу после декапитации и вскрытия замораживали жидким азотом и заливали Extract RNA (ЗАО Евроген). Для определения функционального состояния печени нами было применено определенное количество методик: экстракция тотальной РНК тризоловым методом, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени на приборе Rotor Gene (QIAGEN). Изучение экспрессии генов в печени крыс в норме и при ЭТГ проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных специфических праймеров фирмы «Евроген», содержащих интеркалирующий краситель SYBR Green. Статистические данные, полученные в опытах, обрабатывали с помощью критерия (t) Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

#### **Результаты исследования**

В ходе анализа экспрессии гена GSTM при введении тетрахлорметана получены следующие результаты. При 24-часовом воздействии кратность экспрессии плавно повышалась на промежутке от 0 до 0,25 г/кг (-0,45; 2,63; 4,38; F=4,78; p=0,001). В интервале от 0,25 до 0,5 г/кг наблюдается понижение экспрессии (4,38; 2,31). На промежутке от 0,5 до 1 г/кг изменение экспрессии практически не наблюдается (2,31; 2,02). При увеличении дозировки от 1 до 4 г/кг происходит изменение кратности экспрессии в сторону снижения (2,02; 0,71; -0,56).

Противоположные результаты получились при анализе кратности экспрессии того же гена при 72-часовом воздействии ТХМ с дозировкой до 0,5 г/кг. В интервале от 0 до 0,5 г/кг наблюдалось понижение уровня экспрессии (-0,45; -1,34; -4,15; F=6,15; p=0,001). На промежутке от 0,25 до 0,5 г/кг произошло резкое ее повышение (-4,15; 1,32) и начиная с дозы 0,5 г/кг экспрессия снижалась (1,32; 0,86; -0,52; -4,30). Особенно резкое ее понижение наблюдается в промежутке от 2 до 4 г/кг (-0,52; -4,30). Основным действием четыреххлористого углерода на человека и животных является гепатотоксичность. Но влияние четыреххлористого углерода на живой организм этим не ограничивается. Свободные радикалы, образующиеся при метаболизме CCl<sub>4</sub>, способны оказывать повреждающее действие на другие органы пищеварительной системы и,

прежде всего, на поджелудочную железу [5]. Это особенно заметно при пероральном приеме  $CCl_4$  в организме животного или человека. Экспериментальные поражения печени, смоделированные с использованием четыреххлористого углерода при биохимических изменениях и морфологических характеристиках, довольно близки к острым поражениям печени различной этиологии у людей. В механизме действия  $CCl_4$  на мембраны гепатоцитов одной из ведущих точек является активация перекисного окисления липидов [3]. Острый токсический гепатит характеризуется массивным центрлобулярным некрозом гепатоцитов, что приводит к серьезному нарушению функции печени. Неблагоприятный прогноз обусловлен тяжестью повреждения печени, быстрым развитием характерных морфологических нарушений, которые не оставляют времени для полного осуществления репаративных функций, а также развитием полиорганной недостаточности [7]. Изучая множественность экспрессии GSTM, мы наблюдали увеличение экспрессии при относительно низких дозах четыреххлористого углерода (0,125-1 г/кг). Максимум наблюдался при дозе 0,25 г/кг. По-видимому, истощение этого механизма детоксикации наблюдается быстрее и при дозах 2 и 4 г/кг частота экспрессии не превышает эти показатели в контроле. Интересно отметить, что при анализе экспрессии этого гена через 72 часа после инокуляции наблюдалась обратная пропорция, то есть чем выше экспрессия в первый день, тем ниже она стала на третий. Это обстоятельство можно объяснить подавлением экспрессии этого гена после его максимального увеличения в первый день.

#### **Список литературы:**

1. С.А. Белякин, А. Н. Бобров, С.В. Плюснин. Роль биопсии печени в диагностике алкогольного гепатита. Воен. мед.журн. 2011; № 5: 68–69.
2. А. П. Власов, Н. Д. Бунятян, О.Н. Быханова, Т.И. Григорьева, В.А. Шибитов, С.Г. Анашкин Восстановление детоксиционной способности организма при эндотоксикозе под действием антиоксидантной терапии. Клинич. фармакология и терапия. 2013; № 1: 51 - 54.
3. Галимова С.Ф. Лекарственные поражения печени. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2012;. XXII(3): 38 – 48.
4. П. Ф. Забродский, Б. И. Древяко, В. Г. Мандыч, В.Г. Германчук, С.В. Балашов, А.В. Кузьмин. Изменение токсичности и иммунотоксичности тетрахлор-метана и карбофоса под влиянием 2,4,6-трифенил-4н-селенопирана и их связь с P-450-зависимой монооксигеназной системой. Эксперим. и клинич. фармакология. 2008; 71 (6): 42–44.
5. П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, В. Ф. Киричук, Н. И. Карпенко. Влияние тетрахлорметана на показатели иммунной системы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004; 137(1): 56 – 58.
6. Н. П. Микаелян, А. Е. Гурина, А. В. Микаелян, С.В. Новикова. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы и клиническая характеристика детей, родившихся у родителей, больных сахарным диабетом 1-го типа. Российский мед. журн. 2013; № 5: 33 – 36.

7. А. А. Темнов, Н. А. Онищенко. Контроль продукции активных форм кислорода лейкоцитами позволяет прогнозировать устойчивость организма к стрессорному повреждению. Патол. физиология и эксперим. терапия. 2007; № 2: 9 – 11.
8. Arrak J.K. Toxicopathological and biochemical effects of Carbon Tetrachloride with residual accumulation in Liver of mice. Kufa journal For Veterinary Medical Sciences. 2013; 4 (1): 57 – 68.
9. H. Hayashi, T. Sakai. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011; 300(5): 729 – 738.
10. K. D. Mullen, A. J. McCullough. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. Hepatology. 1989; № 9: 500 – 503.

#### References:

1. S.A. Belyakin, A.N. Bobrov, S.V. Plyusnin. The role of liver biopsy in the diagnosis of alcoholic hepatitis. The military medical journal. 2011; No. 5: 68–69.
2. A.P. Vlasov, N.D. Bunyatyan, O.N. Bykhanova, T.I. Grigoryeva, V.A. Shibitov, S.G. Anaskin. Restoring the body detoxification ability with endotoxemia under the influence of antioxidant therapy. Clinic. pharmacology and therapy. 2013; No. 1: 51 - 54.
3. Galimova S.F. Medicinal liver lesions. Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology. 2012 ;. XXII (3): 38 - 48.
4. P.F. Zabrodsky, B.I. Drevko, V.G. Mandych, V.G. Germanchuk, S.V. Balashov, A.V. Kuzmin. Changes in toxicity and immunotoxicity of tetrachloromethane and karbofos under the influence of 2,4,6-triphenyl-4n-selenopyran and their relationship with the P-450-dependent monooxygenase system. Experiment and clinic. pharmacology. 2008; 71 (6): 42–44.
5. P.F. Zabrodsky, V. G. Germanchuk, V. F. Kirichuk, N. I. Karpenko. The effect of carbon tetrachloride on the performance of the immune system. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2004; 137 (1): 56 - 58.
6. N. P. Mikaelyan, A.E. Gurina, A.V. Mikaelyan, S.V. Novikova. The state of lipid peroxidation processes and the antioxidant system and the clinical characteristics of children born to parents with type 1 diabetes. Russian medical journal 2013; No. 5: 33 - 36.
7. А. А. Темнов, Н. А. Онисченко. Control of the production of reactive oxygen species by leukocytes allows predicting the body's resistance to stress damage. Patol. physiology and experiment. therapy. 2007: No. 2: 9 - 11.
8. Arrak J.K. Toxicopathological and biochemical effects of Carbon Tetrachloride with residual accumulation in Liver of mice. Kufa journal For Veterinary Medical Sciences. 2013; 4 (1): 57 – 68.
9. H. Hayashi, T. Sakai. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. Am J Physiol Gastrointest LiverPhysiol. 2011; 300(5): 729 – 738.
10. K. D. Mullen, A. J. McCullough. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. Hepatology. 1989; № 9: 500 – 503.

Поступила/Received: 23.10.2019

Принята в печать/Accepted: 25.10.2019