

Каримов Д.О., Кутлина Т.Г., Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Байгильдин С.С., Репина Э.Ф.

Метаболические и молекулярно-генетические изменения в печени при интоксикации тетрахлорметаном

ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа

Введение. Токсический гепатит представляет собой сложное и многогранное заболевание, развитие которого опосредовано комплексом биохимических и молекулярно-генетических взаимодействий. Текущее понимание патогенеза токсического гепатита и как следствие его лечение основано на стандартизации фенотипа заболевания, часто без учёта метаболических нарушений внутри клеток.

Материал и методы. Экспериментальные исследования выполнены на белых аутбредных крысах-самцах с массой тела 200–220 г. В качестве токсиканта использовали 50% раствор ТХМ. Биохимические исследования проводили на фотометре лабораторном медицинском «Stat Fax 3300» с использованием клинических тест-наборов и контрольных материалов производства ООО «Вектор-Бест». Ткани печени для гистологического исследования были подвергнуты стандартной процедуре гистологической проводки и заливки в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозин. Анализ экспрессии генов проводили с помощью ПЦР-амплификации в режиме реального времени на приборе RotorGene (QIAGEN). Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием коэффициента корреляции Пирсона и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В результате проведённого анализа корреляции экспрессии изучаемых генов и уровнем биохимических показателей обнаружено, что корреляция экспрессии генов *Nfe2l2* и *Gstm1* составляла $r = 0,812$ ($p = 0,0001$). Динамика экспрессии генов *Chek*, *Gstm1*, *Gstp1*, *Nfe2l2* имела отрицательную корреляцию с показателем активности АСТ в сыворотке крови. А экспрессия генов *Chek*, *Gclc*, *Gstm1*, *Nfe2l2*, *Ripk*, *Sod1* с показателем активности АЛТ в сыворотке крови. Через 72 ч экспрессия практически всех исследуемых генов приобрела разнонаправленный характер. И корреляция между показателями зачастую не определялась. Анализ связи уровня цитолитических ферментов с уровнем корреляции изучаемых генов показал, что через 72 ч корреляция наблюдалась у генов *Gstm1*, *Hmox* и *Sod1* с уровнем АСТ и АЛТ.

К л ю ч е в ы е с л о в а : острый токсический гепатит; парацетамол; четырёххлористый углерод; экспрессия генов.

Для цитирования: Каримов Д.О., Кутлина Т.Г., Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Байгильдин С.С., Репина Э.Ф. Метаболические и молекулярно-генетические изменения в печени при интоксикации тетрахлорметаном. *Гигиена и санитария*. 2020; 99 (9): 996-1000. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-9-996-1000>

Для корреспонденции: Каримов Денис Олегович, канд. мед. наук, зав. отделом токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», 450106, Уфа, Россия. E-mail: karimovdo@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым от 07.02.2020 УГ «О присуждении в 2020 году гранта Республики Башкортостан молодым учёным».

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Каримов Д.О.; сбор и обработка материала – Кутлина Т.Г., Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В.; морфологические исследования – Байгильдин С.С.; статистическая обработка – Каримов Д.О.; написание текста – Каримов Д.О.; редактирование – Репина Э.Ф.; утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила 22.07.2020

Принята к печати 18.09.2020

Опубликована 20.10.2020

Denis O. Karimov, Tatyana G. Kutlina, Guzel' F. Mukhammadiyeva, Yana V. Valova, Samat S. Baygildin, Elvira F. Repina

Metabolic and molecular-genetic changes in the liver during carbon tetrachloride intoxication

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation

Introduction. Toxic hepatitis (TH) is a complex and multifaceted disease, the development of which is mediated by a complex of biochemical and molecular genetic interactions. The current understanding of the pathogenesis of TH and, as a consequence, its treatment is based on standardization of the phenotype of the disease, often without taking into account metabolic disorders within the cells.

Material and methods. experimental studies were performed on white outbred male rats weighing 200–220 g. A 50% solution of TCM was used as a toxicant. Biochemical studies were performed on a laboratory medical photometer “Stat Fax 3300” using clinical test kits and control materials manufactured by Vector-Best LLC. Liver tissue for histological examination was subjected to the standard histological procedure and paraffin embedding. Sections 5–7 μm thick were stained with hematoxylin-eosin. Gene expression analysis was performed using real-time PCR amplification on a RotorGene instrument (QIAGEN). Statistical processing of experimental data was performed using the Pearson correlation coefficient and one-way analysis of variance (ANOVA). The results were considered reliable at $p < 0.05$.

Results. As a result of the analysis of the correlation of the expression of the studied genes and the level of biochemical parameters, it was found that the correlation of the expression of the *Nfe2l2* and *Gstm1* genes was $r = 0.812$ ($p = 0.0001$). The dynamics of gene expression of *Chek*, *Gstm1*, *Gstp1*, *Nfe2l2*, had a negative correlation with the level of AST activity in blood serum and the expression of the genes *Chek*,

Gclc, Gstm1, Nfe2l2, Ripk, Sod1 with an index of ALT activity in the blood serum. After 72 hours, the expression of almost all of the studied genes became multidirectional. The correlation between indices is often not determined. An analysis of the relationship between the level of cytolysis enzymes and the correlation level of the studied genes showed that after 72 hours the correlation was observed in the Gstm1, Hmox, and Sod1 genes with the levels of AST and ALT.

Key words: acute toxic hepatitis; paracetamol; carbon tetrachloride; gene expression.

For citation: Karimov D.O., Kutlina T.G., Mukhammadiyeva G.F., Valova Ya.V., Baygildin S.S., Repina E.F. Metabolic and molecular-genetic changes in the liver during carbon tetrachloride intoxication. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian Journal)*. 2020; 99 (9): 996-1000. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-9-996-1000> (In Russ.)

For correspondence: Denis O. Karimov, MD., Ph.D., head of the Department of toxicology and genetics with the experimental clinic of laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation. E-mail: karimovdo@gmail.com

Conflict of interests. The authors of the article have no conflict of interest.

Acknowledgment. The research was carried out with the support of the grant of the Republic of Bashkortostan to young scientists from 02/07/2020 UG "On the award of the grant of the Republic of Bashkortostan to young scientists in 2020".

Contribution: the concept and design of the study – Karimov D.O.; the collection and processing of material – Kutlina T.G., Mukhammadiyeva G.F., Valova Ya.V.; morphological investigations – Baygildin S.S.; statistical processing – Karimov D.O.; writing text – Karimov D.O.; editing the text – Repina E.F.; approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article – all co-authors.

Received: June 22, 2020

Accepted: September 18, 2020

Published: October 20, 2020

Введение

Токсический гепатит (ТГ) представляет собой сложное и многогранное заболевание, развитие которого опосредовано комплексом биохимических и молекулярно-генетических взаимодействий. Текущее понимание патогенеза токсического гепатита и как следствие его лечение основано на стандартизации фенотипа заболевания, часто без учёта метаболических нарушений внутри клеток. Этиология острого повреждения печени изучена достаточно хорошо [1], но механизмы молекулярно-генетического ответа в зависимости от механизма развития ТГ требуют дальнейшего изучения.

Повреждение печени, вызванное тетрахлорметаном (ТХМ), характеризуется воспалением, истощением антиоксидантного статуса, образованием трихлорметильных радикалов и активных форм кислорода (АФК), которые инициируют перекисное окисление липидов (ПОЛ) [2, 3]. Реактивные метаболиты детоксицируются ферментативно с помощью клеточного антиоксиданта, глутатиона (GSH) или реакции конъюгации, катализируемой глутатион-S-трансферазой (GST). Однако чрезмерное образование свободных радикалов истощает уровни GSH и вызывает окислительный стресс [4]. Глутамат-цистеинлигаза (GCL) является ограничивающим скоростью ферментом для биосинтеза GSH. Было показано, что ТХМ и этанол снижают уровень транскрипции гена *GCLC* и активность антиоксидантных ферментов в тканях печени [5–7].

Цитозольные GST кодируются суперсемейством генов, сгруппированных по классам α , μ , π , σ , θ , ζ и ω по первичной аминокислотной последовательности. Ферменты, которые могут существовать в виде гомо- или гетеродимеров субъединичных полипептидов, катализируют реакции, включающие конъюгирование восстановленного GSH с электрофильными субстратами. Направляя электрофилы, генерируемые цитохромом P450s для конъюгации с GSH, GST способствуют скоординированному метаболизму лекарств и ксенобиотиков, способствуя окончательному выведению потенциальных токсинов [8]. Имеется много данных, доказывающих, что даже однократное воздействие ТХМ на печень вызывает изменение работы антиоксидантной системы в виде снижения уровня SOD, GPx, CAT, GST и GHS [9–12].

Целью проведённого исследования являлось изучение патогенетических основ токсического повреждения печени на модели острого отравления ТХМ.

Материал и методы

Экспериментальные исследования выполнены на белых аутбредных крысах-самцах с массой тела 200–220 г. Животные получали сухой сбалансированный комбикорм «Чара» производства фирмы ООО «МультиТорг» (Россия) и воду в режиме неограниченного доступа. Крыс методом случайной выборки разделили на группы и содержали в клетках по 7 особей при температуре воздуха 21 ± 1 °C. В качестве токсиканта использовали 50% раствор ТХМ, носителем и контрольным веществом (отрицательный контроль) являлось рафинированное оливковое масло, однократное подкожное введение в дозе 2 г/кг массы тела животных.

Условия проведения и вывода животных из эксперимента осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным и требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755). Животных выводили из эксперимента путём эвтаназии с помощью углекислого газа с последующей декапитацией.

Для проведения биохимических исследований использовали сыворотку крови лабораторных животных. На фотометре лабораторном медицинском «Stat Fax 3300» (производство США, фирма «Awareness Technology») определяли биохимические показатели, отражающие метаболизм и функциональное состояние печени: активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы, показатели липидного обмена – содержание холестерина и триглицеридов, а также уровень общего белка, мочевой кислоты с использованием клинических тест-наборов и контрольных материалов производства ООО «Вектор-Бест». Для оценки белковосинтетической функции печени определяли альбумины и фракции глобулинов (α_1 , α_2 , β , γ) методом электрофореза сыворотки крови.

Ткани печени для гистологического исследования фиксировали в 10% формалине на фосфатном буфере (pH 7,4) и подвергали стандартной процедуре гистологической подготовки (через изопропанол) для заливки в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилин-эозин. Гистологические препараты исследовали с помощью световых микроскопов ЛОМО Микмед-2 и Zeiss AXIO Imager D2.

Кусочки печени сразу после декапитации и вскрытия животных замораживали жидким азотом и заливали ExtractRNA (ЗАО Евrogen). Для определения функционального состо-

яния печени использовали следующие методы: экстракция тотальной РНК тризолом, обратная транскрипция и ПЦР-амплификация в режиме реального времени на приборе RotorGene (QIAGEN). Синтез кДНК проводили с матрицы выделенной тотальной РНК с использованием набора реактивов MMLV RT kit и праймеров олиго(dT)15 («Евроген», Россия). С полученными кДНК ставили ПЦР на амплификаторе Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия) в присутствии SYBR Green. Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы PrimerQuest («Integrated DNA Technologies, Inc.», США).

Каждую реакцию ПЦР, содержащую 2 мкл кДНК, проводили в объеме 25 мкл в следующих условиях: предварительный прогрев при 95 °С в течение 3 мин, после чего следовало 45 основных циклов: 15 с при 95 °С, 25 с при 59 °С и 15 с при 72 °С. Нормирование уровня экспрессии проводили по гену *GAPDH*.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием коэффициента корреляции Пирсона и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В печени крыс через 24 ч после введения подсолнечного масла (группа отрицательного контроля) какие-либо признаки повреждения не обнаружены. Границы печеночных долек определяли по расположению центральных вен, а также междольковых сосудов и желчных протоков, вместе составляющих «триады», характерные для печени млекопитающих. Печеночные балки разделялись характерными внутривенными кровеносными капиллярами – синусоидами с различным размером просветов.

На гистологических препаратах печени крыс через 24 ч после введения ТХМ патоморфологические признаки повреждений варьировались от легкой до тяжелой степени (крысы № 1 и № 3) (рис. 1, см. на вклейке). Они выражались в гидропической дистрофии (при легкой степени), переходящей в баллонную дегенерацию, с формированием некротических участков с воспалительными клеточными инфильтрациями (рис. 2, см. на вклейке). Гидропическая дегенерация относится к обратимым изменениям. При улучшении условий и при сохранности клеточных структур клетка восстанавливалась. В случае дальнейшего ухудшения условий цитоплазма увеличивалась приблизительно в два раза, просветлялась, а ядро подвергалось последовательно пикнозу, рексису и лизису. Это состояние, называемое баллонной дегенерацией, относится к необратимым изменениям – клетка погибает. На месте погибших гепатоцитов обычно обнаруживали воспалительные клетки. У крыс № 11 и № 12 выявляли только слабые дистрофические изменения в виде гидропической и мелкокапельной вакуолизации центролобулярных гепатоцитов, а у крыс № 5 – некоторые участки с баллонной дегенерацией. Также у крыс № 5 и № 6 обнаруживали некротические изменения ядер центролобулярных гепатоцитов (рис. 3, см. на вклейке).

У большинства крыс через 72 ч после введения ТХМ в печени балочно-радиальное построение сохранялось вблизи портальных трактов. У них обнаруживали баллонную дегенерацию центролобулярных гепатоцитов, переходящую в мостовидный некроз, перекидывающийся с дольки на дольку (рис. 4, см. на вклейке). У трёх крыс обнаруживали тельца Каунсильмена. В центролобулярной и интермедиарной зоне выявляли крупно- и мелкокапельную вакуолизацию и гидропическую дистрофию печеночных клеток (рис. 5, см. на вклейке). У всех крыс этой группы обнаруживали слабую инфильтрацию воспалительными клетками центролобулярной зоны на месте погибших гепатоцитов и сохранение структуры гепатоцитов 1-й зоны печеночного ацинуса. При этом у крыс через 24 ч после введения ТХМ площадь некротических и дистрофических изменений была менее обширной, и мо-

стовидный некроз обнаружили только в одном гистологическом препарате (крыса № 2). Таким образом, в группе крыс через 72 ч после введения ТХМ обнаруживали наиболее выраженные патоморфологические изменения после введения гепатотоксиканта по сравнению со всеми группами этого эксперимента.

Уровень активности АСТ в сыворотке крови экспериментальных животных через 24 ч после введения токсиканта статистически значимо различался ($F = 5,16$; $p = 0,003$) по сравнению с группой контроля. Максимальный уровень активности фермента зарегистрирован через 24 ч после поступления токсиканта – $263 \pm 25,94$ Ед. Среднее значение активности фермента в сыворотке через 72 ч составило $242,19 \pm 17,56$ Ед/л. При анализе активности АЛТ в сыворотке крови экспериментальных животных в группе, получавшей ТХМ, в зависимости от времени показаны статистически значимые различия ($F = 17,50$; $p = 0,001$). Следует выделить, что максимальный уровень активности фермента в рассматриваемой группе отмечен через 72 ч с момента введения токсиканта – $109,66 \pm 16,07$ Ед/л; в свою очередь минимальный – до затравки ($52,64 \pm 2,01$ Ед/л). Спустя 24 ч с момента затравки ТХМ активность трансаминазы соответствовала отметке $106,13 \pm 9,41$ Ед/л.

При анализе активности гена *Casp7* в печени экспериментальных животных отмечены статистически значимые различия ($F = 7,61$; $p = 0,003$). Так, самый низкий уровень активности данного гена наблюдали в группе животных, участвовавших в эксперименте в течение 24 ч – $0,74 \pm 0,27$. При множественных сравнениях статистическая значимость достигнута при сравнении групп животных, участвовавших в эксперименте 24 ($-0,74 \pm 0,27$). Через 72 ч кратность экспрессии повысилась и достигла уровня $0,79 \pm 0,25$ ($p = 0,02$). В проводимом эксперименте по изучению экспрессии гена *CheK* достигнута статистическая значимость ($F = 7,5$; $p = 0,03$). Множественные сравнения также показали значимую разницу. Так, сравнение группы контроля ($0,001 \pm 0,22$) с 24-часовой группой ($-1,47 \pm 0,38$) показало изменение кратности экспрессии ($p = 0,002$). Статистическую значимость наблюдали и при сравнении двух экспериментальных групп между собой ($p = 0,04$). Уровень экспрессии гена *Gclc* в группе животных спустя 24 часа после начала эксперимента значительно понизился ($-2,52 \pm 0,18$), по сравнению с группой контроля ($0,00 \pm 0,24$). Однако через 72 ч экспрессия имела тенденцию к повышению ($-0,27 \pm 0,34$). Уровень различий достиг статистической значимости при сравнении начального значения экспрессии и спустя 24 ч, а также по прошествии 24 и 72 ч между собой ($p < 0,001$). При изучении экспрессии гена *Gstm1* в группе положительного контроля в ответ на отравление ТХМ обнаружены статистически значимые различия ($F = 22,48$; $p < 0,001$). Через сутки с начала момента эксперимента уровень активности гена был понижен ($0 \pm 0,21$; $-1,25 \pm 0,21$). Спустя 72 ч экспрессия продолжила понижение ($-1,94 \pm 0,18$). Значимости различий достигло сравнение начального уровня экспрессии с экспрессией спустя 24 ($p = 0,001$) и 72 ч ($p < 0,001$).

Статистически значимых изменений экспрессии мРНК гена *Gstp1* через 24 и 72 ч после затравки ТХМ в группе положительного контроля не наблюдали ($F = 3,20$; $p = 0,058$), что может указывать на относительную стабильность данного показателя. Наблюдаемые различия в экспрессии мРНК гена *Gstp1* между группами животных, получавших ТХМ 24 и 72 ч, незначимы ($F = 0,29$; $p = 0,748$). Спустя 72 ч после затравки ТХМ отмечается статистически достоверное повышение количества транскриптов гена *Hmox1* по сравнению с контрольной группой ($2,017 \pm 0,35$; $p = 0,000$). После введения ТХМ активность гена *Nfe2l2* спустя 24 ч характеризуется незначительным понижением экспрессии относительно исходного уровня ($-1,16 \pm 0,21$; $p = 0,01$), в то время как спустя 72 ч экспрессия этого гена практически не отличалась от уровня контроля.

В группе, получавшей ТХМ, экспрессия гена *Nqo1* повышается со временем ($F = 7,120$; $p = 0,004$). Уровень относительной экспрессии гена в начале эксперимента составил $0 \pm 0,37$, спустя 24 ч после отравления составил $0,72 \pm 0,56$ и спустя 72 ч составил $2,39 \pm 0,46$. Таким образом, спустя 72 ч уровень экспрессии гена статистически значимо повышен по сравнению с уровнем экспрессии у животных сразу после отравления ($p = 0,002$). Экспрессия гена *RIPK1* снижается со временем ($F = 4,065$; $p = 0,030$). Уровень относительной экспрессии гена спустя 24 ч после отравления значимо снизился и составил $-0,85 \pm 0,25$ (начальный уровень экспрессии составил $0 \pm 0,22$; $p = 0,041$), а спустя 72 ч несколько повысился и составил $-0,65 \pm 0,17$. Введение ТХМ через 24 ч сопровождалось статистически значимым снижением кратности экспрессии гена *Sod1* ($-1,18 \pm 0,18$) относительно контрольной группы ($p = 0,0001$), но уже через 72 ч происходило некоторое увеличение экспрессии гена до $-0,63 \pm 0,16$, однако отмеченные различия не достигли статистической значимости ($p = 0,060$).

Полученные результаты, по-видимому, свидетельствуют об истощении антиоксидантной системы в условиях окислительного стресса, вызванного интоксикацией ТХМ. Известно, что изменение активности антиоксидантных ферментов может приводить к увеличению окислительного стресса, что в свою очередь способствует повышенному уровню окислительного повреждения клеточных макромолекул и изменённому ответу на стресс [13].

Интерес представляет изучение взаимодействия и корреляции молекулярно-генетических изменений и классических биохимических показателей. Как показано на рис. 6, см. на вклейке, в первые 24 ч наблюдается положительная корреляция экспрессии практически всех изучаемых генов за исключением *Gstm1* и *Nqo1*.

Нередко наблюдали довольно сильную корреляционную связь между уровнем экспрессии разных генов. Так, корреляция экспрессии генов *Nfe2l2* и *Gstm1* составляла $r = 0,812$ ($p = 0,0001$). Обращает на себя внимание корреляция экспрессии практически всех генов системы *GSH*. В то же время при анализе корреляции экспрессии генов с уровнем цитозольных ферментов в сыворотке крови наблюдается обратная картина. Динамика экспрессии генов *Chek*, *Gstm1*, *Gsp1*, *Nfe2l2* имела отрицательную корреляцию с показателем активности АСТ в сыворотке крови ($r = -0,589$; $p = 0,027$; $r = -0,626$; $p = 0,017$; $r = -0,588$; $p = 0,027$; $r = -0,657$; $p = 0,011$ соответственно). А экспрессия генов *Chek*, *Gclc*, *Gstm1*, *Nfe2l2*, *Ripk*, *Sod1* – с показателем активности АЛТ в сыворотке крови ($r = -0,605$; $p = 0,022$; $r = -0,794$; $p = 0,001$; $r = -0,746$; $p = 0,002$; $r = -0,640$; $p = 0,014$; $r = -0,630$; $p = 0,016$; $r = -0,739$; $p = 0,003$ соответственно).

Через 72 ч после поступления токсиканта в организм лабораторных животных наблюдается отличающаяся картина (рис. 7, см. на вклейке).

Как видно из рис. 7, экспрессия практически всех исследуемых генов приобрела разнонаправленный характер. И корреляция между показателями зачастую не определяется. Исключением являлись гены *Chek* – *Casp7*, корреляция между которыми составила $r = -0,610$, $p = 0,020$; гены *Ripk* – *Gclc* – $r = 0,698$, $p = 0,006$ и *Gstm1*, у которого наблюдалась обратная корреляция экспрессии с генами *Hmox*, *Nqo1*, *Ripk* ($r = -0,725$; $p = 0,003$; $r = -0,719$; $p = 0,004$; $r = -0,709$; $p = 0,005$, соответственно).

Анализ связи уровня цитозольных ферментов с уровнем корреляции изучаемых генов показал, что через 72 ч корреляция наблюдалась у генов *Gstm1*, *Hmox* и *Sod1* с уровнем АСТ ($r = -0,657$; $p = 0,011$; $r = 0,670$; $p = 0,009$; $r = -0,650$; $p = 0,012$ соответственно) и уровнем АЛТ ($r = -0,570$; $p = 0,033$; $r = 0,622$; $p = 0,018$; $r = -0,574$; $p = 0,032$ соответственно).

Обсуждение

Проблема лечения и профилактики заболеваний гепатобилиарной системы до настоящего времени остаётся окончательно не решённой. Токсические поражения печени характеризуются многообразием этиологических факторов, сложностью патогенеза и полиморфным течением, что создаёт трудности в лечении [14]. Профилирование экспрессии показало взаимодействие молекулярно-генетических механизмов, связанных с четырёххлористым углеродом [15].

Считается, что транскрипционный фактор NRF2, кодируемый геном *Nfe2l2*, является основным сенсором окислительного стресса в клетке [16]. При окислительном стрессе NRF2 перемещается в ядро, где связывается с промоторной областью антиоксидантных генов и инициирует их транскрипцию [17]. В настоящем эксперименте спустя 24 ч отмечалось угнетающее воздействие ТХМ на экспрессию гена *Nfe2l2* во всех экспериментальных группах. Однако уже спустя 72 ч уровень экспрессии нормализуется.

Имеются данные, что первыми в борьбу с окислительным стрессом включаются неферментативные, низкомолекулярные антиоксиданты, и только после их истощения активируется система ферментов. Однако при чрезмерном образовании инициаторов свободнорадикального окисления истощается пул и неферментных антиоксидантов и ферментативного звена этой системы, что приводит к подавлению их активности [18]. Если окислительно-восстановительное равновесие в клетке удаётся восстановить, то в клетке включаются механизмы репарации, и она выходит из состояния стресса.

Через 72 ч во всех экспериментальных группах отмечалось повышение уровня экспрессии до исходного. Вероятно, на 3-и сутки происходит постепенное уменьшение производства свободных радикалов, вызванное введением токсиканта, и восстановление окислительно-восстановительного баланса клетки.

Активация гена *Nfe2l2* приводит к активации каскада противоокислительных механизмов организма, задействованных в нейтрализации химических веществ и АФК: НАД(Ф)-Н: хининоксидоредуктаза 1 (*Nqo1*), глутатионцистеинлигаза (*Gclc*), ферменты суперсемейства GST (*Gstm1*, *Gstp1*).

Восстановленный GSH является внутриклеточным антиоксидантом, играя роль «ловушки» свободных радикалов, данные процессы катализируются глутатионпероксидазой и глутатионтрансферазой, восстанавливая окисленный глутаредоксин [12]. Повышение экспрессии гена *Gstm1* после интоксикации может подтверждать данный вывод. Интересным представляется то, что наблюдалось увеличение экспрессии глутатионтрансфераз только класса Т, что, по-видимому, можно объяснить активным участием именно данного класса при интоксикации ТХМ.

Ген *Nqo1* кодирует цитоплазматическую форму фермента НАД(Ф) Н-дегидрогеназы, которая образует гомодимеры и восстанавливает хиноны до гидрохинонов. Уровень экспрессии данного гена повышался на протяжении проведённого эксперимента, что может говорить о высокой степени участия данного механизма детоксикации при отравлении ТХМ. При анализе корреляции уровня экспрессии гена *Nqo1* с биохимическими показателями не были показаны статистически значимые различия, что может говорить о разном времени активации данных механизмов.

Следует отметить, что накопление большого количества АФК и повреждение ДНК нередко приводит к активации апоптотических механизмов гибели клеток. Существует ряд цистеиновых протеаз, которые активируют апоптотические пути. Каспаза 7 (*Casp7*) относится к эффекторным каспазам, которая гидролизует целевые белки и инициирует апоптоз [12]. В соматических клетках нижестоящая трансдуцирующая киназа или Checkpoint киназа (*Chk1*) передаёт сигнал о по-

вреждении ДНК, опосредованный АФК [9, 18]. Взаимодействующая с рецептором протеинкиназа 1 (Ripk1) регулирует гибель и воспаление клеток с помощью киназозависимых и независимых механизмов. Ripk1 облегчает активацию путей МАРК и NF-κВ и ингибирует каспазо-8-зависимый апоптоз [17]. В результате проведенного исследования не показано выраженного повышения экспрессии генов клеточного цикла и активации апоптоза, но обнаружена их значительная корреляция с уровнем представленности генов, задействованных в обмене GSH. Данное обстоятельство может объясняться активацией процессов регенерации паренхимы печени, вследствие чего активность проапоптотического класса генов снижается.

Заключение

Механизмы повреждения гепатоцитов значительно варьируются в зависимости от токсичного агента, вследствие чего происходит активация различных защитных механизмов детоксикации и антиоксидантной защиты организма. В результате работы показано, что экспрессия ключевых генов детоксикации (*Nfe2l2*, *Gstm1*, *Chek1*, *Nqo1*) имеет зависимость от механизма повреждения гепатоцитов, что в дальнейшем может служить в качестве диагностических маркеров, способных объяснить механизм повреждения и подобрать наиболее подходящую при данном виде отравления терапию.

Литература

(п.п. 1–13, 15, 17 см. References)

- | | |
|--|--|
| <p>14. Мязин Р.Г., Снигур Г.Л., Емельянов Д.Н., Чернышова М.В. Фармакологическая коррекция экспериментального острого токсического гепатита. <i>Журнал анатомии и гистопатологии</i>. 2019; 8(1): 49–54. https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-49-54</p> <p>16. Шиндяпин А.В. <i>Молекулярно-биологические основы контроля эндо-</i></p> | <p><i>генного метанола и формальдегида у млекопитающих</i>: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2017.</p> <p>18. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. <i>Успехи современного естествознания</i>. 2006; (7): 29–36.</p> |
|--|--|

References

- | | |
|--|--|
| <p>1. Shah M.D., D'souza U.J., Iqbal M. The potential protective effect of <i>Comelina nudiflora</i> L. against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatotoxicity in rats, mediated by suppression of oxidative stress and inflammation. <i>Environ. Health Prev. Med.</i> 2017; 22(1): 66. https://doi.org/10.1186/s12199-017-0673-0</p> <p>2. Yang C., Li L., Ma Z., Zhong Y., Pang W., Xiong M., et al. Hepatoprotective effect of methyl ferulic acid against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. <i>Exp. Ther. Med.</i> 2018; 15(3): 2228–38. https://doi.org/10.3892/etm.2017.5678</p> <p>3. Zhou C., Yin S., Yu Z., Feng Y., Wei K., Ma W., et al. Preliminary characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from Taishan <i>Pinus massoniana</i> pollen. <i>Molecules</i>. 2018; 23(2): 281. https://doi.org/10.3390/molecules23020281</p> <p>4. Jeong T.B., Kwon D., Son S.W., Kim S.H., Lee Y.H., Seo M.S., et al. Weaning mice and adult mice exhibit differential carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity. <i>Antioxidants (Basel)</i>. 2020; 9(3): 201. https://doi.org/10.3390/antiox9030201</p> <p>5. Ji L.L., Sheng Y.C., Zheng Z.Y., Shi L., Wang Z.T. The involvement of p62-Keap1-Nrf2 antioxidative signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity. <i>Free Radic. Biol. Med.</i> 2015; 85: 12–23. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.035</p> <p>6. Chen H.W., Huang C.S., Li C.C., Lin A.H., Huang Y.J., Wang T.S., et al. Bioavailability of andrographolide and protection against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. <i>Toxicol. Appl. Pharmacol.</i> 2014; 280(1): 1–9. https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.07.024</p> <p>7. Lee S.Y., Ko K.S. Effects of s-adenosylmethionine and its combinations with taurine and/or betaine on glutathione homeostasis in ethanol-induced acute hepatotoxicity. <i>J. Cancer Prev.</i> 2016; 21(3): 164–72. https://doi.org/10.15430/jcp.2016.21.3.164</p> <p>8. Vaughn M.P., Biswal Shinohara D., Castagna N., Hicks J.L., Netto G., De Marzo A.M., et al. Humanizing π-class glutathione S-transferase regulation in a mouse model alters liver toxicity in response to acetaminophen overdose. <i>PLoS One</i>. 2011; 6(10): e25707. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025707</p> | <p>9. Zarezade V., Moludi J., Mostafazadeh M., Mohammadi M., Veisi A. Antioxidant and hepatoprotective effects of <i>Artemisia dracunculus</i> against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. <i>Avicenna J. Phytomed.</i> 2018; 8(1): 51–62.</p> <p>10. Dadkhah A., Fatemi F., Ababzadeh S., Roshanaei K., Alipour M., Tabrizi B.S. Potential preventive role of Iranian <i>Achillea wilhelmsii</i> C. Koch essential oils in acetaminophen-induced hepatotoxicity. <i>Bot. Stud.</i> 2014; 55(1): 37. https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-37</p> <p>11. Hasanein P., Sharifi M. Effects of rosmarinic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity in male Wistar rats. <i>Pharm. Biol.</i> 2017; 55(1): 1809–16. https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1331248</p> <p>12. Acharya M., Lau-Cam C.A. Comparison of the protective actions of N-acetylcysteine, hypotaurine and taurine against acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. <i>J. Biomed. Sci.</i> 2010; 17(Suppl. 1): S35. https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S35</p> <p>13. Lee J., Koo N., Min D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. <i>Compr. Rev. Food Sci. F.</i> 2004; 3(1): 21–33.</p> <p>14. Mязин Р.Г., Снигур Г.Л., Емельянов Д.Н., Чернышова М.В. Фармакологическая коррекция экспериментального острого токсического гепатита. <i>Журнал анатомии и гистопатологии</i>. 2019; 8(1): 49–54. https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-49-54 (in Russian)</p> <p>15. Huang Q., Jin X., Gaillard E.T., Knight B.L., Pack F.D., Stoltz J.H., et al. Gene expression profiling reveals multiple toxicity endpoints induced by hepatotoxicants. <i>Mutat. Res.</i> 2004; 549(1–2): 147–67. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.12.020</p> <p>16. Шиндяпин А.В. <i>Molecular biological principles of control of endogenous methanol and formaldehyde in mammals</i>: Diss. Moscow; 2017. (in Russian)</p> <p>17. Merry T.L., Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the antioxidant response in mice. <i>J. Physiol.</i> 2016; 594(18): 5195–207. https://doi.org/10.1113/jp271957</p> <p>18. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах. <i>Успехи современного естествознания</i>. 2006; (7): 29–36. (in Russian)</p> |
|--|--|

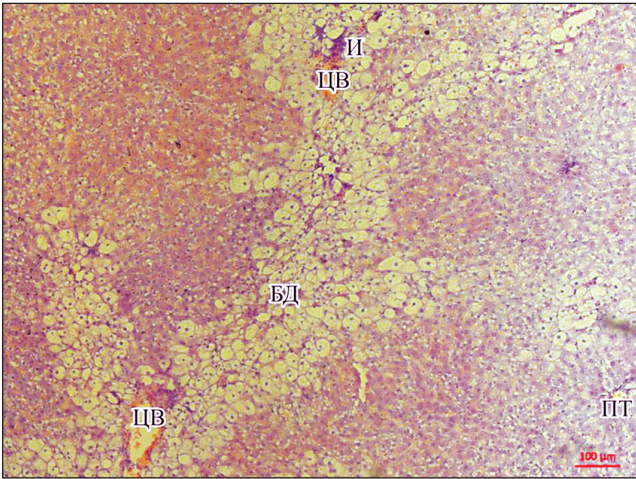


Рис. 1. Паренхима печени крысы № 1 через 24 ч после введения раствора ТХМ.
БД – баллонная дегенерация; ЦВ – центральная вена; И – воспалительный клеточный инфильтрат; ПТ – портальный тракт.
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. × 100.

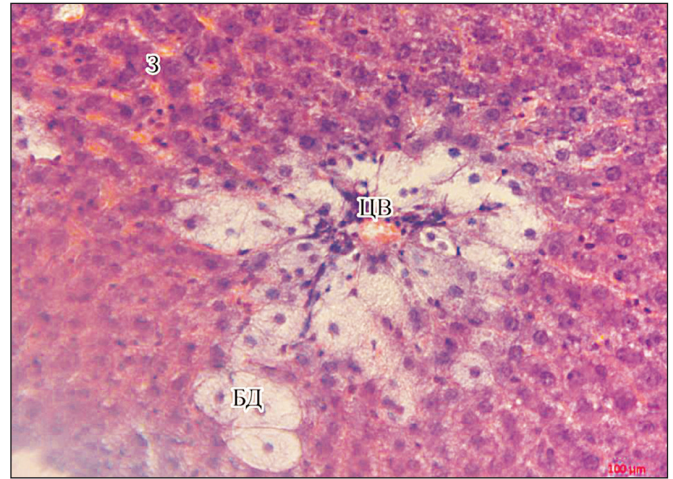


Рис. 2. Центральная вена печени крысы № 3 через 24 ч после введения раствора ТХМ.
З – застой крови в синусоидах; ЦВ – центральная вена.
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. × 400.

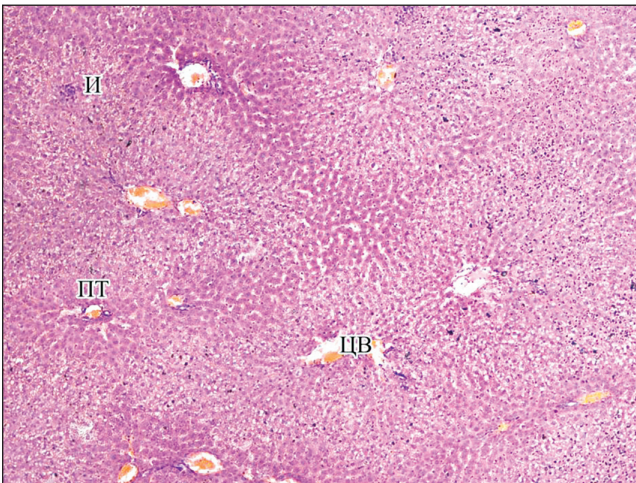


Рис. 3. Паренхима печени крысы № 5 через 24 ч после введения раствора ТХМ.
БД – баллонная дегенерация; ЦВ – центральная вена; И – воспалительный клеточный инфильтрат.
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. × 100.

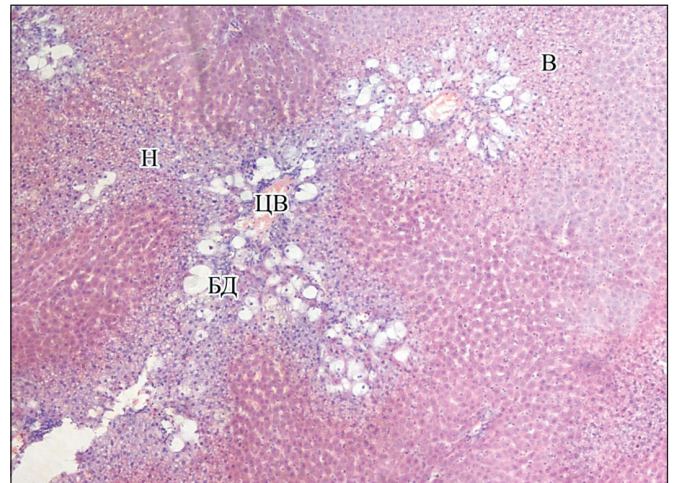


Рис. 4. Паренхима печени крысы № 8 через 72 ч после введения раствора ТХМ.
БД – баллонная дегенерация; В – вакуольная дистрофия; Н – некроз гепатоцитов; ЦВ – центральная вена.
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. × 100.

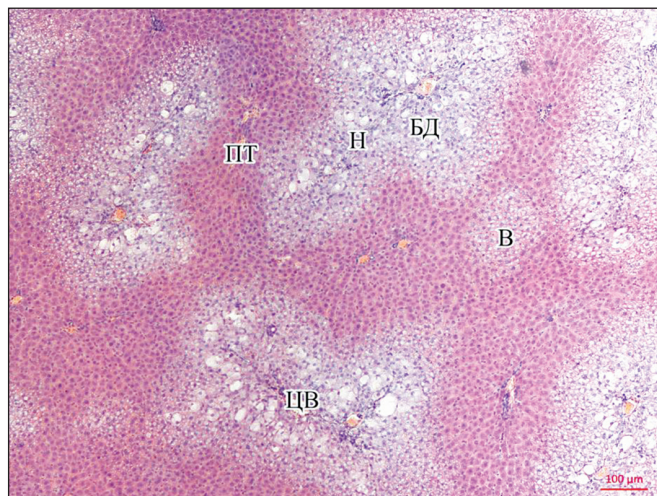


Рис. 5. Паренхима печени крысы № 13 через 72 ч после введения раствора ТХМ.
БД – баллонная дегенерация; В – вакуольная дистрофия; ПТ – портальный тракт; Н – некроз гепатоцитов; ЦВ – центральная вена.
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. × 100.

	Casp7	Chek	Gclc	Gstm1	Gstp1	Gstm1	Gstp1	Gstm1	Hmoх	Nfe2l2	Nqo1	Ripk	Sod1	ACT	АЛТ	ЛДГ	ЩФ	ТГ	ХСТ	Белок	МК	альбумин	альфа1	альфа2	beta	гамма	АГ
Casp7	1	,534	,442	,764	,459	-,422	,113	,541	-,027	,584	,437	-,462	-,530	-,019	-,434	,140	,042	,778	-,483	,438	-,133	-,077	-,345	-,085	,451		
Chek	,534	1	,500	,746	,581	-,294	,140	,498	-,114	,681	,460	-,589	-,605	,096	-,403	,402	,382	,606	-,154	,641	,040	-,128	-,047	-,644	,637		
Gclc	,442	,500	1	,582	,316	-,110	-,436	,592	-,028	,528	,748	-,339	-,794	,018	-,544	,376	,498	,584	-,594	,753	-,243	-,080	-,379	-,458	,750		
Gstm1	,764	,746	,582	1	,679	-,384	,286	,812	-,186	,666	,639	-,626	-,746	-,083	-,590	,074	,384	,795	-,458	,642	-,116	-,090	-,386	-,284	,645		
Gstp1	,459	,581	,316	,679	1	-,416	,151	,667	-,023	,573	,281	-,588	-,238	-,042	-,466	,254	,489	-,355	,404	,153	-,505	-,352	-,144	,394			
Gstm1	-,422	-,294	-,110	-,384	-,416	1	-,288	-,645	,030	-,338	,219	,529	,151	,314	-,010	-,114	-,005	-,178	,021	-,020	,146	,185	,352	-,360	-,010		
Hmoх	,113	,140	-,436	,286	,151	-,288	1	,112	-,128	-,157	-,248	-,252	,106	-,444	-,019	,014	,101	,438	-,240	,132	-,022	,231	,172	-,252			
Nfe2l2	,541	,498	,592	,812	,667	-,645	,112	1	-,216	,587	,467	-,657	-,640	-,165	-,527	,117	,338	,536	-,540	,497	-,127	-,224	-,620	,041	,495		
Nqo1	-,027	-,114	-,028	-,128	-,023	,030	-,128	1	-,147	-,004	-,364	,076	-,191	-,154	-,142	-,532	,054	,085	-,241	,071	-,055	,264	,041	-,244			
Ripk	,584	,681	-,338	-,157	-,147	-,338	-,157	,587	1	,387	-,464	-,630	,231	-,438	,230	,221	,490	-,365	,569	-,081	-,310	-,367	-,288	,588			
Sod1	,437	,460	,219	-,248	,387	,219	-,248	,467	-,004	,387	1	-,418	-,739	,296	-,543	,175	,459	,789	-,694	,631	,068	-,089	-,215	-,516	,636		
ACT	-,462	-,589	-,529	-,252	-,588	-,529	-,252	-,657	-,364	-,418	1	,484	,052	-,126	-,047	-,641	-,641	,340	-,181	-,307	,424	,043	,182	-,176			
АЛТ	-,530	-,605	,151	,106	-,238	,151	,106	-,640	,076	-,630	,484	1	-,138	,600	-,118	-,443	-,619	,558	-,551	,092	-,004	-,269	,375	-,563			
ЛДГ	-,019	,096	-,083	-,444	-,042	,314	-,444	-,165	-,191	,231	,296	,052	-,138	1	,195	,166	,354	,181	-,443	-,149	,586	-,326	,223	-,270	-,133		
ЩФ	-,434	-,403	-,010	-,019	-,466	-,010	-,019	-,527	-,154	-,438	-,543	,554	,600	,195	1	,122	,004	-,471	,524	-,407	-,101	,241	,198	,290	-,419		
ТГ	,140	,402	-,114	-,194	-,028	-,114	-,194	,117	-,142	,230	,175	-,126	-,166	-,166	1	,052	,132	,369	,125	,575	-,206	-,051	-,225	-,337	,561		
ХСТ	,042	,382	-,005	-,014	-,042	-,005	-,014	,354	,484	,221	,459	-,047	-,443	,004	,052	1	,369	1	-,291	,347	,213	-,295	-,071	-,393	,324		
Белок	,778	,606	-,584	,795	,489	-,178	,101	,536	,054	,490	,789	-,641	-,619	-,471	,132	,369	1	-,584	,503	,503	,135	-,236	-,088	-,433	,504		
МК	-,483	-,154	-,594	-,458	-,355	,021	,438	-,540	,085	-,365	-,694	,340	,558	-,443	,524	,125	-,584	1	-,238	1	-,238	-,251	,287	,309	-,256		
альбумин	,438	,641	,753	,642	,404	-,020	,438	,497	,068	,631	-,307	,340	,558	-,443	,575	,503	,347	-,238	-,238	1	-,495	,144	,424	-,473	,999		
альфа1	-,133	,040	-,243	,116	,153	,146	,132	-,127	,071	,068	-,307	,092	,586	-,101	-,206	,213	,135	-,251	-,495	1	-,495	1	-,712	,424	-,503		
альфа2	-,077	-,128	-,080	-,090	-,505	,185	-,022	-,224	-,055	-,310	-,089	,424	-,004	-,326	,241	-,051	-,295	-,236	,287	,144	-,712	1	,070	-,052	,161		
бетта	-,345	-,047	-,379	-,386	-,352	,352	,231	-,620	,264	-,367	-,215	,043	,269	,223	,198	-,225	-,071	-,088	,309	-,473	,424	,070	1	-,453	-,471		
гамма	-,085	-,644	-,458	-,284	-,144	-,360	,172	,041	,041	-,288	-,516	,182	,375	-,270	,290	-,337	-,393	-,433	,121	-,528	-,104	-,052	-,453	1	-,529		
АГ	,451	,637	,750	,645	,394	-,010	-,252	,495	-,244	,588	,636	-,176	-,563	-,133	-,419	,561	,324	,504	-,256	,999	-,503	,161	-,471	-,529	1		

Рис. 6. Корреляционная матрица уровня экспрессии генов-кандидатов и биохимических показателей через 24 ч после затравки ТХМ.

Casp7	1	-610	,071	-1,116	,124	,389	,496	,455	,251	,069	-0,95	,455	,401	-334	,200	-1,141	-503	,510	,419	-470	,439	,328	,438	-262	-465
Chck	-610	1	,038	-1,151	,407	-0,17	-0,070	-496	,164	-232	,212	-353	-445	-0,008	-1,166	,099	,231	-497	-1,169	,214	-273	-284	-1,141	,290	,218
Gclc	,071	,038	1	,311	-0,015	-303	-247	,451	-480	,698	,074	,029	-0,40	,200	-381	,181	,069	-207	-1,130	,124	-306	-333	,058	,423	,133
Gstm1	-1,116	-1,151	,311	1	-222	,084	-725	,340	-719	,709	,657	-657	-570	,707	-643	,442	,558	-0,96	-682	,774	-759	-600	,700	,520	,775
Gstp1	,124	,407	-0,015	-222	1	,128	,321	-1,181	,352	-0,79	,118	,093	,096	-325	-0,11	,007	-481	,271	-0,42	,137	,080	-0,75	,295	-0,001	-139
Gstt1	,389	-0,17	-303	,084	,128	1	,003	-0,089	,144	-209	,123	-1,155	-381	-1,165	-1,110	,248	-0,91	-0,54	,152	,010	,099	,400	-1,157	-351	,013
Hmx	,496	-0,70	-247	,003	,321	,003	1	-200	,658	-459	-305	,670	,622	-761	,723	-209	-615	,367	,685	-789	,784	,354	,609	-282	-789
Nfe2l2	,455	-496	,451	-340	-1,181	-0,89	-200	1	-268	,319	,022	,139	,105	,246	-434	-0,77	-1,12	,311	-0,30	-0,10	-1,174	-2,11	,091	,379	-0,002
Nqo1	,251	,164	-480	-719	,352	,144	,658	-268	1	-797	-338	,460	,529	-694	,458	-430	-462	,255	,615	-654	,644	,498	,678	-490	-658
Ripk	,069	-232	,698	,709	-0,79	-209	-459	,319	-797	1	,463	-323	-274	,522	-415	,129	,276	-0,92	-460	,502	-544	-540	-337	,441	,503
Sod1	-0,95	,212	,074	,657	,118	,123	-305	,139	-338	,463	1	-650	-574	,544	-381	,193	,565	-0,49	-395	,686	-668	-776	-460	,517	,680
ACT	,455	-353	,029	-657	,093	-1,155	,670	,139	,460	-323	-650	1	,865	-637	,697	-516	-610	,491	,512	-746	,654	,523	,626	-305	-743
ALP	,401	-445	-0,40	-570	,096	-381	,622	,105	,529	-274	-574	,865	1	-540	,620	-557	-568	,542	,634	-681	,641	,398	,680	-364	-683
ЛДГ	-334	-0,08	,200	,707	-325	-1,165	-761	,246	-694	,522	,544	-637	-540	1	-468	,300	,813	-0,40	-364	,908	-896	-629	,631	,425	,909
ЩФ	,200	-1,166	-381	-643	-0,11	-1,110	,723	-434	,458	-415	-381	,697	,620	-468	1	-257	-209	,437	,534	-490	,543	,449	,355	-416	-492
ТГ	-1,141	,099	-1,181	,442	,007	,248	-209	-0,77	-430	,129	,193	-557	-568	,300	-257	1	,171	-101	-402	,369	-272	-216	-692	,306	,379
ХСТ	-503	,231	,069	,558	,481	,091	-615	-610	-462	,276	,565	-610	-568	,813	-209	1	1	-225	-270	,828	-788	-507	-613	,327	,827
Белок	,510	-497	-207	-0,96	,271	-0,54	,367	-0,30	,255	-0,92	-460	,491	,542	-0,40	,437	-101	1	1	,289	-172	,120	,113	,342	-162	-175
МК	,419	-169	-130	-682	,774	-759	-600	,700	,520	,775	-682	,774	-759	-600	,700	,520	,775	-682	,774	-759	-600	,700	,520	,775	-682
альбумин	-470	,214	,124	,774	-137	,010	-999	,400	-157	-351	,013	-789	-002	-470	,214	,124	,774	-137	,010	-999	,400	-157	-351	,013	-789
альфа1	,439	-273	-306	-759	,080	,099	,733	,669	-605	-951	,439	-273	-306	-759	,080	,099	,733	,669	-605	-951	,439	-273	-306	-759	,080
альфа2	,328	-284	-333	,058	,423	,133	,775	-682	-789	-002	-470	,214	,124	,774	-137	,010	-999	,400	-157	-351	,013	-789	-002	-470	,214
бетта	,438	-141	,058	-700	,295	-0,001	-139	,013	-789	-002	-470	,214	,124	,774	-137	,010	-999	,400	-157	-351	,013	-789	-002	-470	,214
гамма	-262	,290	,423	,520	,775	-682	-789	-002	-470	,214	,124	,774	-137	,010	-999	,400	-157	-351	,013	-789	-002	-470	,214	,124	,774
А_Г	-465	,218	,133	,775	-682	-789	-002	-470	,214	,124	,774	-137	,010	-999	,400	-157	-351	,013	-789	-002	-470	,214	,124	,774	-137

Рис. 7. Корреляционная матрица уровня экспрессии генов-кандидатов и биохимических показателей через 72 ч после затравки ТХМ.