

## MOLECULAR GENETICS IN THE STUDY OF PRODUCTION-CONDITIONED TOXIC HEPATITIS

Repina E.F.<sup>1</sup>, Karimov D.O.<sup>2</sup>, Yakupova T.G.<sup>3</sup> (Russian Federation) Email: Repina564@scientifictext.ru

<sup>1</sup>Repina Elvira Faritovna - PhD in Medicine, Researcher;

<sup>2</sup>Karimov Denis Olegovich - PhD in Medicine, Researcher;

<sup>3</sup>Yakupova Tatyana Grigoryevna - PhD in Medicine, Researcher,

TOXICOLOGY DEPARTMENT,

FEDERAL BUDGET INSTITUTION OF SCIENCE

UFA RESEARCH INSTITUTE OF OCCUPATIONAL MEDICINE AND HUMAN ECOLOGY,

UFA

**Abstract:** an experiment in rats was conducted to study the expression of the *GSTM* gene in hepatocytes 24 and 72 hours after seeding with tetrachloromethane at different doses. The multiplicity of *GSTM* expression was increased at low doses of carbon tetrachloride (0.125-1 g / kg), after 24 hours. The maximum was observed at a dose of 0.25 g / kg. At high doses, this detoxification mechanism was depleted and the multiplicity of expression did not exceed these parameters in the control group. When analyzing the expression of this gene 72 hours after the primer, an inversely proportional dependence was observed, that is, the higher the expression was on the first day, the lower it became on the third day.

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

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА В ИЗУЧЕНИИ ПРОИЗВОДСТВЕННО-ОБУСЛОВЛЕННЫХ ТОКСИЧЕСКИХ ГЕПАТИТОВ

Репина Э.Ф.<sup>1</sup>, Каримов Д.О.<sup>2</sup>, Якупова Т.Г.<sup>3</sup> (Российская Федерация)

<sup>1</sup>Репина Эльвира Фаритовна - кандидат медицинских наук, научный сотрудник;

<sup>2</sup>Каримов Денис Олегович - кандидат медицинских наук, научный сотрудник;

<sup>3</sup>Якупова Татьяна Григорьевна - кандидат медицинских наук, научный сотрудник,

отдел токсикологии,

Федеральное бюджетное учреждение науки

Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека,

г. Уфа

**Аннотация:** эксперимент на крысах был проведен с целью изучения экспрессии гена *GSTM* в гепатоцитах через 24 и 72 часа после затравки тетрахлорметаном в разных дозах. Кратность экспрессии *GSTM* повышалась при малых дозах тетрахлорметана (0,125 – 1 г/кг), через 24 часа. Максимум наблюдался при дозе 0,25 г/кг. При затравках высокими дозами наблюдалось истощение данного механизма детоксикации и кратность экспрессии не превышала данные показатели в группе контроля. При анализе экспрессии этого гена через 72 часа после затравки наблюдалась обратно пропорциональная зависимость, то есть, чем выше была экспрессия на первые сутки, тем ниже она стала на третьи.

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

В связи с растущим загрязнением окружающей среды и ростом промышленности токсическое поражение печени в настоящее время привлекает особое внимание многих исследователей. Печень занимает центральное место в процессах углеводного, белкового, липидного, пигментного метаболизма, а также в процессах детоксикации многочисленных веществ, попадающих в организм, как извне, так и из кишечника и, в частности, путем их окисления, конъюгирования, декарбоксилирования [1]. Воздействие на организм чужеродных веществ, обладающих токсическими свойствами, может оказывать значительное влияние на печень, приводящее к формированию ее токсического поражения. Развитие данного патологического состояния обусловлено несколькими группами этиологических факторов: интоксикацией гепатотропными веществами (тетрахлорметан, бензол), лекарственными препаратами (парацетамол, антидепрессанты, противовоспалительные средства, тетрациклин и др.), этанолом и его суррогатами. Токсические агенты приводят к развитию печеночной недостаточности, опухолям, гепатитам и циррозу [2].

Тетрахлорметан (ТХМ, СС14, четыреххлористый углерод) является одним из наиболее хорошо изученных гепатотропных ядов. По своим физическим свойствам представляет бесцветную летучую жидкость, он плохо растворим в воде, обладает резким специфическим запахом [8]. Четыреххлористый

углерод смешивается неполярными органическими растворителями, применяется в промышленности как растворитель жиров, при химической чистке одежды. В атмосферу  $CCl_4$  поступает в составе промышленных выбросов предприятий химической промышленности. Четыреххлористый углерод образуется вместе с другими галогенопроизводными метана при хлорировании питьевой воды. Отравление экспериментальных животных  $CCl_4$  по биохимическим показателям и морфологической характеристике близко к острым поражениям печени различной этиологии наблюдаемых у человека [4]. Характер поражения печени зависит от количества и концентрации вводимого ТХМ и продолжительности проводимого эксперимента. При метаболизме четыреххлористого 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 конъюгацию восстановленной формы глутатиона (GSH) к ксенобиотическим субстратам с целью детоксикации. Семейство GST состоит из трех надсемейств: цитозольного, митохондриального и микросомального. GSTs – ключевой компонент второй фазы детоксикации ксенобиотиков. Описаны несколько изоформ глутатион-S-трансфераз (A1, M1, P1, T1 и др.). Гены, которые кодируют белки глутатион-S-трансферазной активности (GSTT, GTP и GSTM), известные как ферменты 2-й фазы детоксикации ксенобиотиков [9]. Гены GSTT, GSTM и GTP кодируют различные типы глутатион-S-трансфераз – T1, M1 и P1. Глутатион-S-трансферазы активно участвуют в детоксикации ряда ксенобиотиков путем их связывания с глутатионом и играют ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окислению липидов, свободным радикалам, алкилированию белков и мутаций ДНК. Экспрессия генов GST имеет тканеспецифические особенности: так, GSTM выявляется во многих тканях, в том числе в лимфоидных органах и лимфоцитах, фермент также обнаружен 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%-ного 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 использовано 84 белых беспородных крыс (12 крыс в контрольной группе и 72 – в экспериментальной) с массой 170 – 190 грамм. 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, рекомендациями 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 тризольным 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 специфичных праймеров фирмы «Евроген», содержащего интеркалирующий краситель SYBR Green. Статистические данные, полученные в опытах, обрабатывали с помощью критерия (t) Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Результаты исследования: При анализе экспрессии гена GSTM при введении тетрахлорметана получились следующие результаты. При 24 часовом воздействии кратность экспрессии плавно повышалась на промежутке от 0 г/кг до 0,25 г/кг (-0,45; 2,63; 4,38; F=4,78; p=0,001). В интервале от 0,25 г/кг до 0,5 г/кг наблюдается понижение экспрессии (4,38; 2,31). Затем, на промежутке от 0,5 г/кг до 1 г/кг изменение экспрессии практически не наблюдается (2,31; 2,02). При увеличении дозировки от 1 г/кг 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 г/кг 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 г/кг 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 г/кг до 4 г/кг (-0,52; -4,30). Основным эффектом тетрахлорметана на организм человека и животных является гепатотоксичность. Но воздействие четыреххлористого углерода на живой организм этим не ограничивается. Образующиеся

при метаболизме  $CCl_4$  свободные радикалы способны оказывать повреждающий эффект и на другие органы пищеварительной системы и, в первую очередь, на поджелудочную железу [5]. Особенно это выражено при пероральном поступлении  $CCl_4$  в организм животного или человека. Моделируемые с использованием четыреххлористого углерода экспериментальные поражения печени по биохимическим изменениям и морфологическим характеристикам достаточно близки к острым поражениям печени различной этиологии у человека. В механизме действия  $CCl_4$  на мембраны гепатоцитов одним из ведущих моментов является активация процессов перекисного окисления липидов [3]. Острый токсический гепатит характеризуется массивным центрлобулярным некрозом гепатоцитов, что приводит к тяжелым нарушениям функции печени. Неблагоприятный прогноз обусловлен тяжестью печеночного повреждения, быстротой развития характерных морфологических нарушений, не оставляющих времени для полноценной реализации репаративных функций, а также развитием полиорганной недостаточности [7]. Изучая кратность экспрессии GSTM мы наблюдали повышение экспрессии при относительно малых дозах тетрахлорметана (0,125 – 1 г/кг). Максимум при 0,25 г/кг. По-видимому, истощение данного механизма детоксикации наблюдается быстрее и при дозах 2 и 4 г/кг кратность экспрессии не превышает данные показатели в контроле. Интересно отметить, что при анализе экспрессии этого гена через 72 часа после затравки наблюдалась обратно пропорциональная зависимость, то есть, чем выше была экспрессия на первые сутки, тем ниже она стала на третьи. Данное обстоятельство можно объяснить подавлением экспрессии этого гена после максимального ее повышения в первые сутки.

#### *Список литературы / References*

1. *Белякин С.А.* Роль биопсии печени в диагностике алкогольного гепатита / С.А. Белякин, А.Н. Бобров, С.В. Плюснин // *Воен. мед. журн.*, 2011. № 5. С. 68–69.
2. Восстановление детоксиционной способности организма при эндотоксикозе под действием антиоксидантной терапии / А.П. Власов, Н.Д. Бунятян, О.Н. Быханова, Т.И. Григорьева, В.А. Шибитов, С.Г. Анашкин // *Клинич. фармакология и терапия*, 2013. № 1. С. 51-54.
3. *Галимова С.Ф.* Лекарственные поражения печени / С.Ф. Галимова // *Российский журн. гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии*, 2012. Т. XXII. № 3. С. 38 – 48.
4. Изменение токсичности и иммунотоксичности тетрахлор-метана и карбофоса под влиянием 2,4,6-трифенил-4н-селенопирана и их связь с Р-450-зависимой монооксигеназной системой / П.Ф. Забродский, Б.И. Древкин, В.Г. Мандыч, В.Г. Германчук, С.В. Балашов, А.В. Кузьмин // *Эксперим. и клинич. Фармакология*, 2008. Т. 71. № 6. С. 42–44.
5. Влияние тетрахлорметана на показатели иммунной системы / П.Ф. Забродский, В.Г. Германчук, В.Ф. Киричук, Н.И. Карпенко // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2004. Т. 137. № 1. С. 56–58.
6. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы и клиническая характеристика детей, родившихся у родителей, больных сахарным диабетом 1-го типа / Н.П. Микаелян, А.Е. Гурина, А. В. Микаелян, С.В. Новикова // *Российский мед. журн.*, 2013. № 5. С. 33–36.
7. *Темнов А.А.* Контроль продукции активных форм кислорода лейкоцитами позволяет прогнозировать устойчивость организма к стрессорному повреждению / А.А. Темнов, Н.А. Онищенко // *Патол. физиология и эксперим. Терапия*, 2007. № 2. С. 9–11.
8. *Arrak J.K.* Toxicopathological and biochemical effects of Carbon Tetrachloride with residual accumulation in Liver of mice / J.K. Arrak // *Kufa journal For Veterinary Medical Sciences*, 2013. Vol. 4. № 1. P. 57–68.
9. *Hayashi H.* Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models / H. Hayashi, T. Sakai // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 2011. Vol. 300 (5). P. 729–738.
10. *Mullen K.D.* Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization / K.D. Mullen, A.J. McCullough // *Hepatology*, 1989. № 9. P. 500–503.