



Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Бакиров А.Б., Зиятдинова М.М., Валова Я.В.,
Кудояров Э.Р., Хуснутдинова Н.Ю., Якупова Т.Г.

Динамика экспрессии гена супероксиддисмутазы-1 при разных видах лекарственной коррекции токсических нарушений в печени

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

Введение. Для предотвращения развития токсических повреждений печени необходимы лекарственные средства, препятствующие окислительному стрессу. Актуальным и перспективным является использование анализа изменения экспрессии генов под влиянием препаратов для оценки эффективности их применения, а также для выявления молекулярно-генетических механизмов развития гепатотоксичности.

Цель исследования – изучение изменения экспрессии гена *Sod1* в паренхиме печени крыс при интоксикации тетрахлорметаном с последующей терапией с помощью гепатопротекторов оксиметилурацил (ОМУ), «Мексидол» и «Гептор».

Материалы и методы. Эксперимент поставлен на 70 особях беспородных белых крыс мужского пола. Контрольная группа получала подкожно оливковое масло; 1-я опытная группа – подкожно тетрахлорметан (ТХМ); 2-я опытная группа – ТХМ и внутривенно «Гептор»; 3-я опытная группа – ТХМ и подкожно «Мексидол»; 4-я опытная группа – ТХМ и перорально ОМУ. Забор материала проводили в два временных промежутка: 24 и 72 ч. Анализ экспрессии изучаемого гена проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Применение всех трёх препаратов через 72 ч приводило к снижению уровня экспрессии гена *Sod1* при окислительном стрессе, вызванном ТХМ. Наибольшее влияние на транскрипционную активность гена *Sod1* оказывал ОМУ.

Ограничения исследования обусловлены методологией проводимого анализа: поскольку экспрессия оценивалась методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, мы оценивали транскрипционную активность гена без учёта дальнейшей посттранскрипционной регуляции экспрессии. **Заключение.** Результаты исследования свидетельствуют о способности изученных гепатопротекторов подавлять экспрессию гена *Sod1* в печени крыс при воздействии ТХМ. Можно предположить, что изученные препараты через изменение экспрессии гена *Sod1* могут участвовать в регуляции свободнорадикальных процессов при патологии печени.

Ключевые слова: токсические поражения печени; гепатопротекторы; тетрахлорметан; экспрессия; ген *Sod1*

Соблюдение этических стандартов. Исследование одобрено биоэтической комиссией ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», проведено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, использующихся в научных целях.

Для цитирования: Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Бакиров А.Б., Зиятдинова М.М., Валова Я.В., Кудояров Э.Р., Хуснутдинова Н.Ю., Якупова Т.Г. Динамика экспрессии гена супероксиддисмутазы-1 при разных видах лекарственной коррекции токсических нарушений в печени. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(1): 83-86. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-1-83-86>

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

Участие авторов: Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф. – концепция и дизайн исследования, написание текста; Бакиров А.Б. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Зиятдинова М.М., Кудояров Э.Р., Хуснутдинова Н.Ю., Якупова Т.Г. – сбор и обработка материала; Валова Я.В. – статистическая обработка данных. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 01.09.2021 / Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликовано: 09.02.2022

Denis O. Karimov, Guzel F. Mukhammadiyeva, Akhat B. Bakirov, Munira M. Ziatdinova,
Yana V. Valova, Eldar R. Kudoyarov, Nadezhda Yu. Khusnutdinova, Tatyana G. Yakupova

Dynamics of superoxide dismutase-1 gene expression in different types of drug correction of toxic disorders in the liver

Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russia

Introduction. Drugs are needed to counteract oxidative stress to prevent toxic liver damage. Relevant and promising is the use of analysis of changes in gene expression under the influence of drugs to assess the effectiveness of their use and identify the molecular genetic mechanisms of the development of hepatotoxicity. **The purpose of this study** was to examine the effect of the drugs “Heptor”, “Mexidol”, and “Oxymethyluracil” (OMU) on the level of expression of the *Sod1* gene in the liver of rats with carbon tetrachloride lesion of the liver.

Material and methods. The experiment was performed on 70 male outbred white rats. The control group received olive oil subcutaneously; first experimental group – subcutaneous carbon tetrachloride (CTC); second experimental group – CTC and intraperitoneal “Heptor”; third experimental – CTC and subcutaneous “Mexidol”; fourth experimental – CTC and oral OMU. The material was collected at two-time intervals, 24 and 72 hours. To analyze the expression of the studied gene, quantitative RT-PCR in real-time mode was carried.

Results. The use of all three drugs after 72 h resulted in a decrease in the *Sod1* gene expression level under oxidative stress induced by CTC. OMU exerted the most significant influence on the transcriptional activity of the *Sod1* gene.

Limitations. The limitations of the study are due to the methodology of the analysis: since expression was evaluated by quantitative RT-PCR in real time, we evaluated the transcriptional activity of the gene without taking into account further post-transcriptional regulation of expression.

Conclusion. The study results indicate the ability of the studied hepatoprotectors to suppress the expression of the *Sod1* gene in rat liver when exposed to CTC. It can be assumed that the studied drugs, through a change in the expression of the *Sod1* gene, can participate in the regulation of free radical processes in liver damage.

Keywords: toxic liver damage; hepatoprotectors; carbon tetrachloride; expression; gene *Sod1*

The conclusion of the committee on biomedical ethics: the study was approved by the bioethical commission of the Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, conducted under the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments or Other Scientific Purposes (ETS N 123), Directive of the European Parliament and Council of the European Union 2010/63/EU of 22.09.2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

For citation: Karimov D.O., Mukhammadiyeva G.F., Bakirov A.B., Ziatdinova M.M., Valova Ya.V., Kudoyarov E.R., Khusnutdinova N.Yu., Yakupova T.G. Dynamics of superoxide dismutase-1 gene expression in different types of drug correction of toxic disorders in the liver. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(1): 83-86. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-1-83-86> (In Russian)

For correspondence: Denis O. Karimov, MD, PhD, Head of the Department for Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals, Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106, Russian Federation. E-mail: karimovdo@gmail.com

Information about the authors:

Karimov D.O., <https://orcid.org/0000-0003-0039-6757>

Mukhammadiyeva G.F., <https://orcid.org/0000-0002-7456-4787>

Bakirov A.B., <https://orcid.org/0000-0003-3510-2595>

Ziatdinova M.M., <https://orcid.org/0000-0002-1848-7959>

Valova Ya.V., <https://orcid.org/0000-0001-6605-9994>

Kudoyarov E.R., <https://orcid.org/0000-0002-2092-1021>

Yakupova T.G., <https://orcid.org/0000-0002-1236-8246>

Khusnutdinova N.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-5596-8180>

Contribution: Karimov D.O., Mukhammadiyeva G.F. – research concept and design, writing the text. Bakirov A.B. – research concept and design, editing. Ziatdinova M.M., Kudoyarov E.R., Khusnutdinova N.Yu., Yakupova T.G. – collection and processing of material. Valova Ya.V. – statistical data processing. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Acknowledgements. The study had no sponsorship.

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

Received: September 1, 2021 / Accepted: November 25, 2021 / Published: February 09, 2022

Введение

Печень, являясь важнейшим органом, обезвреживающим химические вещества, оказывается основной мишенью их токсического действия. С каждым годом отмечается рост числа токсических поражений печени различной этиологии [1, 2]. Одна из ключевых ролей в патогенезе данных патологий отведена оксидативному стрессу с формированием избытка свободных радикалов, приводящих к повреждению и гибели гепатоцитов [3]. Для изучения механизмов гепатотоксичности и поиска новых гепатопротекторов используется большое число экспериментальных моделей на животных. Однако тетрахлорметановая модель токсического поражения печени является одной из наиболее распространённых [4]. Гепатотоксичность тетрахлорметана (ТХМ) в значительной степени обусловлена его промежуточными продуктами метаболизма, такими как трихлорметильный (CCl_3) и трихлорметилпероксильный (CCl_3OO) свободные радикалы [5]. Эти радикалы могут связываться с белками и липидами клеточной мембраны и запускать перекисное окисление липидов, которое вызывает повреждение печени [6].

К одному из ключевых элементов защиты организма от окислительного стресса относятся супероксиддисмутазы – семейство металлосодержащих белков, метаболизирующих супероксидные радикалы. Фермент купроэнзим цитозоля Cu/Zn-супероксиддисмутазы (СОД1), кодируемый геном *Sod1*, участвует в антиоксидантной защите тканей, нейтрализуя активные формы кислорода. Он содержится в основном в цитоплазме клеток, но был найден также в межмембранном пространстве митохондрий печени крыс [7]. Известно, что истощение антиоксидантных ферментов при воздействии ТХМ не только вызывает окислительный стресс, но также вызывает нарушение структуры и функции ферментов [8]. Многочисленные исследования указывают на всё больший интерес к использованию антиоксидантов в качестве терапевтических средств для снижения повышенного окислительного стресса при различных заболеваниях и патофизиологических расстройствах [9]. Свободнорадикальная концепция поражения печени обосновывает использование в гепатологии многих препаратов с антиоксидантной активностью. Вместе с тем для лучшего понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе поражения печени, а также для оценки эффективности применения лекарственных средств необходимо проводить анализ экспрессии генов, вовлечённых в антиоксидантную защиту.

Цель работы – изучение изменения экспрессии гена *Sod1* в паренхиме печени крыс при интоксикации тетрахлорметаном с последующей терапией с помощью гепатопротекторов оксиметилурацил (ОМУ), «Мексидол» и «Гептор».

Материалы и методы

Экспериментальная работа была проведена на 70 особях белых беспородных крыс мужского пола, с массой тела от 170 до 200 г. Крысы содержались в виварии в стандартных условиях. Все животные были поделены на 5 экспериментальных групп по 14 особей. Контрольной группе вводили подкожно оливковое масло. Группе положительного контроля вводили подкожно 50% ТХМ в оливковом масле в дозе 2 г/кг массы тела. В группе лечения препаратом «Гептор» крысам вводили подкожно 50% ТХМ в оливковом масле в дозе 2 г/кг массы тела и внутривентриально «Гептор» в дозе 72 мг/кг массы тела. В группе лечения препаратом «Мексидол» крысам вводили подкожно 50% ТХМ в оливковом масле в дозе 2 г/кг массы тела и подкожно «Мексидол» в дозе 50 мг/кг массы тела. В группе лечения препаратом ОМУ крысам вводили подкожно 50% ТХМ в оливковом масле в дозе 2 г/кг массы тела и перорально ОМУ в дозе 50 мг/кг массы тела. Все лекарственные препараты вводили предварительно за 1 ч до введения токсиканта. Забор материала проводили после декапитации под наркозом с углекислым газом через 24 и 72 ч после введения токсикантов. При содержании и забое крыс соблюдались все правила и нормы по этическому и гуманному отношению к животным.

Образцы печени растирали в жидком азоте. Затем заливали ExtractRNA («Евроген», Россия), после чего выделяли РНК, согласно инструкции производителя. На полученной РНК синтезировали кДНК с помощью MMLV RT kit («Евроген», Россия), согласно инструкции. Анализ экспрессии изучаемого гена *Sod1*, а также референтного гена *Gapdh* проводили с помощью количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

Проверку данных на нормальность распределения проводили с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. При статистической обработке результатов применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), *t*-критерий Стьюдента. Пороговое значение уровня значимости принимали равным 0,05. Расчёты проводили с использованием пакета программ Statistics 21.0 (IBM, США).

Результаты

Мы сравнили действие трёх препаратов – «Гептор», «Мексидол» и ОМУ – на транскрипционную активность гена *Sod1* в печени крыс. Статистические данные, полученные в результате эксперимента, представлены на рис. 1 и 2 в виде кратности изменения экспрессии исследуемого гена. Данные по эксперименту спустя 24 ч показаны на рис. 1. Представленные данные свидетельствуют о том, что через 24 ч введение ТХМ сопровождалось значимым снижением кратности экспрессии гена *Sod1* до $-1,18 \pm 0,18$ по сравнению с контролем ($p = 0,003$). В группах, получавших препараты гепатопротекторов, через 24 ч происходило незначительное повышение экспрессии относительно группы положительного контроля ($p > 0,05$). Уровень экспрессии практически не отличался в разных группах, получавших гепатопротекторы; кратность экспрессии в группах, получавших «Гептор»,

«Мексидол» и ОМУ, составила $-0,87 \pm 0,17$; $-0,80 \pm 0,21$ и $-0,74 \pm 0,25$ соответственно.

Вместе с тем несколько иным был профиль экспрессии гена *Sod1* в печени крыс через более продолжительный период времени (72 ч) после воздействия ТХМ (см. рис. 2). Так, наблюдалось некоторое возрастание уровня транскрипции гена *Sod1* до $-0,63 \pm 0,16$ по сравнению с 24-часовым показателем ($-1,18 \pm 0,18$), однако он оставался сниженным относительно показателя у животных контрольной группы, не достигнув при этом уровня статистической значимости ($p = 0,060$) (см. рис. 2). Наряду с этим применение всех трёх гепатопротекторных препаратов через 72 ч сопровождалось уменьшением транскрипционной активности гена *Sod1*, однако в разной степени. Следует отметить, что наибольшее снижение уровня экспрессии по отношению к аналогичному показателю у крыс, получавших только ТХМ, отмечалось при использовании ОМУ, кратность экспрессии составила $-1,24 \pm 0,13$ ($p = 0,043$).

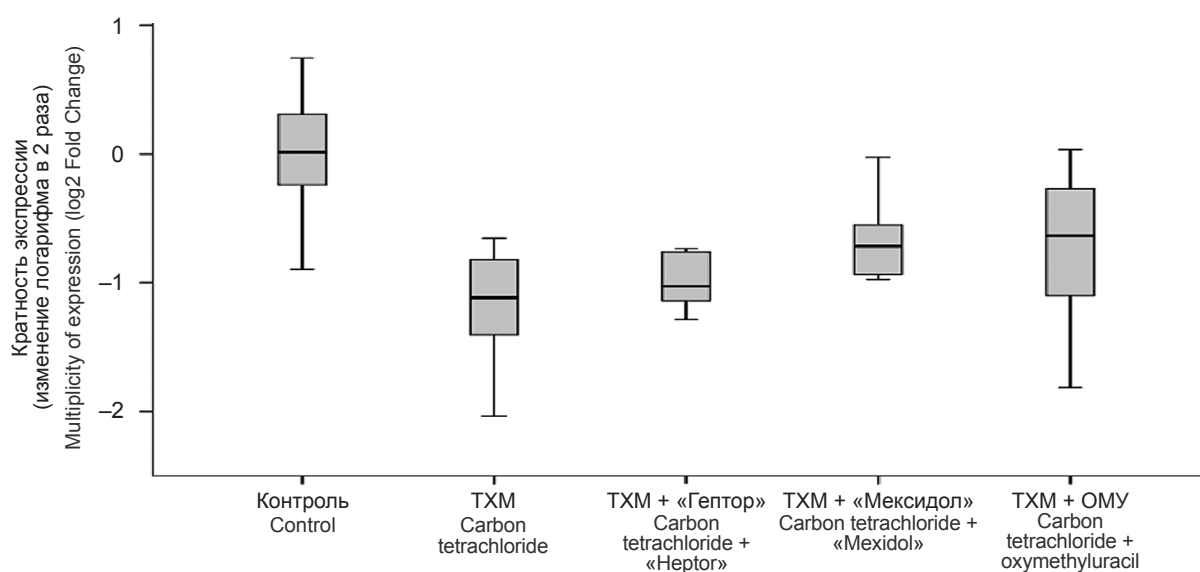


Рис. 1. Кратность экспрессии гена *Sod1* при интоксикации ТХМ под влиянием гепатопротекторов через 24 ч.

Fig. 1. The multiplicity of the *Sod1* gene expression during carbon tetrachloride (CTC) intoxication under the influence of hepatoprotectors after 24 hours.

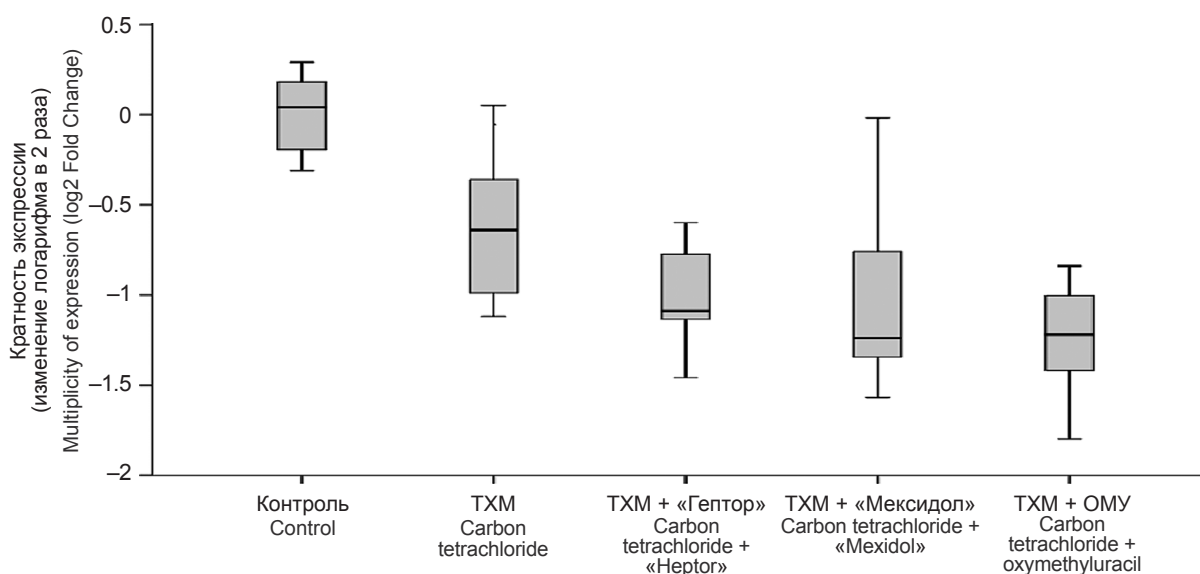


Рис. 2. Кратность экспрессии гена *Sod1* при интоксикации ТХМ под влиянием гепатопротекторов через 72 ч.

Fig. 2. The multiplicity of the *Sod1* gene expression during CTC intoxication under the influence of hepatoprotectors after 72 hours.

Обсуждение

В данном исследовании анализ экспрессии гена *Sod1*, кодирующего фермент антиоксидантной системы защиты организма, выявил снижение содержания транскриптов данного гена через 24 ч после введения ТХМ. Это, по-видимому, свидетельствует об истощении антиоксидантной системы в условиях окислительного стресса, вызванного интоксикацией ТХМ. Установленный в настоящей работе характер изменения профиля экспрессии гена *Sod1* в печени крыс при воздействии ТХМ согласуется с данными других авторов [10, 11]. Изменение активности генов антиоксидантных ферментов и, как следствие, повышение их транскрипционной активности может способствовать усилению окислительного стресса, что приводит к дополнительному повреждению клеток [12]. Недавние исследования показали тесную связь между окислительным стрессом и уровнем антиоксидантных ферментов [13].

В нашей работе показана способность исследованных препаратов подавлять экспрессию гена *Sod1* в условиях токсического поражения печени ТХМ. Через 72 ч снижения критичности экспрессии исследуемого гена при применении гепатопротекторов, вероятно, происходит благодаря антиоксидантным свойствам действующих веществ, входящих в состав препаратов, которые, очевидно, уменьшают нагрузку на антиоксидантные ферменты. Уменьшение активности гена *Sod1* у животных, получавших ОМУ наряду с введени-

ем ТХМ в этом эксперименте, может быть связано с непосредственным влиянием производного пиримидина — оксиметилурацила (5-гидрокси-6-метилурацил) на радикальные процессы окисления [14], способствующим предотвращению процессов, ведущих к повреждению клеток печени, в условиях окислительного стресса. Вместе с тем указанный эффект ОМУ, видимо, усиливается при более длительном воздействии препарата.

Ограничения исследования обусловлены методологией проводимого анализа, поскольку экспрессия оценивалась методом количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, мы оценивали транскрипционную активность гена без учёта дальнейшей посттранскрипционной регуляции экспрессии.

Заключение

Таким образом, полученные нами результаты демонстрируют, что применение препаратов «Гептор», «Мексидол» и ОМУ приводит к подавлению экспрессии гена *Sod1* при окислительном стрессе, вызванном ТХМ. Причём наибольшее влияние на транскрипционную активность гена *Sod1* оказывает ОМУ. Можно предположить, что изученные препараты через изменение экспрессии гена *Sod1* могут участвовать в регуляции свободнорадикальных процессов при патологии печени.

Литература

(п.п. 3–13 см. References)

1. Королева М.В. Экзогенно-токсический гепатит. Современный взгляд на этиологию, патогенез, клиническое течение. *Лекарственный вестник*. 2015; 9(2): 18–22.
2. Авдеева М.Г., Кулбужева М.И., Колодзько Е.И., Черникова Н.В., Запашная О.В. Проблемы лечения токсического гепатита на фоне хронического вирусного поражения печени HCV-этиологии. Клинический пример успешной терапии. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2018; 23(1): 50–6. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2018-23-1-50-56>
14. Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Срубиллин Д.В., Гимадиева А.Р. Экспериментальная оценка производных пиримидина на моделях токсического поражения печени: обзор. *Научное обозрение. Медицинские науки*. 2016; (3): 88–98.

References

1. Koroleva M.V. Exogenous-toxic hepatitis. Modern view on the etiology, pathogenesis, clinical course. *Lekarstvennyy vestnik*. 2015; 9(2): 18–22. (in Russian)
2. Avdeeva M.G., Kulbuzheva M.I., Kolod'ko E.I., Chernikova N.V., Zapashnyaya O.V. Problems of treatment of toxic hepatitis on the background of chronic viral lesion of HCV-etiology. *Klinicheskiy primer uspezhnoy terapii. Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2018; 23(1): 50–6. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2018-23-1-50-56> (in Russian)
3. Li S., Tan H.Y., Wang N., Zhang Z.J., Lao L., Wong C.W., et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 2015; 16(11): 26087–124. <https://doi.org/10.3390/ijms161125942>
4. Ingawale D.K., Mandlik S.K., Naik S.R. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ. Toxicol. Pharmacol*. 2014; 37(1): 118–33. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.08.015>
5. Nada S.A., Omara E.A., Abdel-Salam O.M., Zahran H.G. Mushroom insoluble polysaccharides prevent carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rat. *Food Chem. Toxicol*. 2010; 48(11): 3184–8. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.019>
6. Debnath S., Ghosh S., Hazra B. Inhibitory effect of *Nymphaea pubescens* Willd. flower extract on carrageenan-induced inflammation and CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2013; 59: 485–91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.036>
7. Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem*. 2001; 276(42): 38388–93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105395200>
8. Szymonik-Lesiuk S., Czechowska G., Stryjecka-Zimmer M., Słomka M., Madro A., Celiński K., et al. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg*. 2003; 10(4): 309–15. <https://doi.org/10.1007/s00534-002-0824-5>
9. Aggarwal B.B., Harikumar K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2009; 41(1): 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.010>
10. Manubolu M., Goodla L., Ravilla S., Thanasekaran J., Dutta P., Malmlof K., et al. Protective effect of *Actinopterys radiata* (Sw.) Link. against CCl₄ induced oxidative stress in albino rats. *J. Ethnopharmacol*. 2014; 153(3): 744–52. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.040>
11. Goodla L., Manubolu M., Pathakoti K., Jayakumar T., Sheu J.R., Fraker M., et al. Protective effects of *Ammannia baccifera* against CCl₄-induced oxidative stress in rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16(8): 1440. <https://doi.org/10.3390/ijerph16081440>
12. Lee J., Koo N., Min D.B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. F*. 2004; 3(1): 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>
13. Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *Biomed. Res. Int*. 2014; 2014: 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
14. Myshkin V.A., Enikeev D.A., Srubilin D.V., Gimadieva A.R. Experimental evaluation of pyrimidine derivatives using models of the toxically damaged liver: a review. *Nauchnoe obozrenie. Meditsinskie nauki*. 2016; (3): 88–98. (in Russian)