

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-194-10-132-137>

Экспрессия гена *Sod1* в условиях экспериментальной этаноловой интоксикации и введения гепатопротекторных препаратов

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

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Россия, 450106, Уфа, ул. Степана Кувыкина, 94

Для цитирования: Мухаммадиева Г.Ф., Бакиров А.Б., Каримов Д.О., Валова Я.В., Зиятдинова М.М., Кудояров Э.Р., Репина Э.Ф., Якупова Т.Г. Экспрессия гена *Sod1* в условиях экспериментальной этаноловой интоксикации и введения гепатопротекторных препаратов. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2021;194(10): 132–137. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-194-10-132-137

✉ Для переписки:

Мухаммадиева
Гузель Фанисовна
ufniimt@mail.ru

Мухаммадиева Гузель Фанисовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Бакиров Ахат Бариевич, д.м.н., профессор, директор

Каримов Денис Олегович, к.м.н., заведующий отделом токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Валова Яна Валерьевна, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Зиятдинова Мунира Мунировна, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Кудояров Эльдар Ренатович, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Репина Эльвира Фаридовна, к.м.н., старший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Якупова Татьяна Георгиевна, младший научный сотрудник отдела токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных

Резюме

Цель исследования заключалась в изучении влияния гепатопротекторных препаратов на экспрессию гена *Sod1* у крыс с поражением печени этанолом.

Материалы и методы. В эксперименте использовали самцов беспородных белых крыс. Было сформировано пять групп животных по 14 особей в каждой. Крысам 1-й группы (контроль) вводили дистиллированную воду; 2-й группы — этанол; 3-й группы — этанол и гептор; 4-й группы — этанол и мексидол; 5-й группы — этанол и ОМУ. Препараты вводили за 1 час до введения этанола. Через 24 и 72 ч после введения этанола (по 7 особей) животных декапитировали и извлекали печень. Уровень экспрессии гена *Sod1* оценивали при помощи ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени.

Результаты. Кратность экспрессии гена *Sod1* в печени крыс через 24 ч практически не изменялась в ответ на введение животным этанола. Тенденция к незначительному снижению наблюдалась в отношении изменений экспрессии *Sod1* при применении гептора и мексидола, тогда как под влиянием ОМУ уровень экспрессии умеренно возрастал. Через 72 ч воздействие этанола сопровождалось небольшим снижением кратности экспрессии гена *Sod1*. Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении изменений экспрессии *Sod1* при применении гептора, мексидола и ОМУ.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение как этанола, так и профилактическое применение гепатопротекторных препаратов не приводило к существенным изменениям уровня экспрессии гена *Sod1* в печени крыс. Необходимы дополнительные исследования, направленные на выявление механизмов регуляции антиоксидантной системы, а также поиск лекарственных средств, влияющих на транскрипционную активность генов.

Ключевые слова: этанол; окислительный стресс; поражения печени; гепатопротекторные препараты; экспрессия генов; супероксиддисмутазы

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-194-10-132-137>

Expression of the *Sod1* gene under conditions of experimental ethanol intoxication and administration of hepatoprotective drugs

G. F. Mukhammadiyeva, A. B. Bakirov, D. O. Karimov, Ya. V. Valova, M. M. Ziatdinova, E. R. Kudoyarov, E. F. Repina, T. G. Yakupova
Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, ul. Stepana Kuvykina 94, Ufa, 450106 Russia

For citation: Mukhammadiyeva G. F., Bakirov A. B., Karimov D. O., Valova Ya. V., Ziatdinova M. M., Kudoyarov E. R., Repina E. F., Yakupova T. G. Expression of the *Sod1* gene under conditions of experimental ethanol intoxication and administration of hepatoprotective drugs. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2021;194(10): 132–137. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-194-10-132-137

Guzel F. Mukhammadiyeva, Candidate of Biological Sciences, Senior researcher at the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0001-8798-0846

✉ *Corresponding author:*

Guzel F. Mukhammadiyeva
ufniimt@mail.ru

Akhat B. Bakirov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director; ORCID: 0000-0001-6593-2704

Denis O. Karimov, Candidate of Medical Sciences, Head of the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0003-0039-6757

Yana V. Valova, Junior researcher at the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0001-6605-9994

Munira M. Ziatdinova, Junior researcher at the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0002-1848-7959

Eldar R. Kudoyarov, Junior researcher at the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0002-2092-1021

Elvira F. Repina, Candidate of Medical Sciences, Senior researcher at the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0001-8798-0846

Tatyana G. Yakupova, Junior researcher at the Department of Toxicology and Genetics with The Experimental Clinics for Laboratory Animals; ORCID: 0000-0002-1236-8246

Summary

The aim of the study was to study the effect of hepatoprotective drugs on the expression of the *Sod1* gene in rats with ethanol liver damage.

Materials and methods. Male outbred white rats were used in the experiment. Five groups of animals were formed, 14 individuals each. Distilled water was administered to rats of the 1st group (control); Group 2 — ethanol at a dose of 5 g/kg of body weight; Group 3 — ethanol and heptor at a dose of 72 mg/kg; Group 4 — ethanol and mexidol at a dose of 50 mg/kg; Group 5 — ethanol and OMU at a dose of 50 mg/kg. The drugs were administered 1 hour before the introduction of ethanol. 24 and 72 hours after the introduction of ethanol (7 individuals), the animals were decapitated and the liver was removed. The expression level of the *Sod1* gene was assessed using real-time reverse transcription PCR.

Results. The fold change in *Sod1* expression in rat liver after 24 h practically did not change in response to the introduction of ethanol to the animals. A tendency to a slight decrease was observed in relation to changes in the expression of *Sod1* with the use of heptor and mexidol, while under the influence of OMU, the expression level increased moderately. After 72 h, the exposure to ethanol was accompanied by a slight decrease in the frequency of expression of the *Sod1* gene. A similar trend was observed with respect to changes in *Sod1* expression with the use of heptor, mexidol, and OMU.

Conclusion. The results obtained indicate that the introduction of both ethanol and the prophylactic use of hepatoprotective drugs did not lead to significant changes in the level of *Sod1* gene expression in rat liver. Additional studies are needed to identify the mechanisms of regulation of the antioxidant system, as well as the search for drugs that affect the transcriptional activity of genes.

Keywords: ethanol; oxidative stress; liver damage; hepatoprotective drugs; gene expression; superoxide dismutases

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Алкоголь является одним из основных факторов риска развития хронических заболеваний в мире. Он может вызвать поражение различных органов и целых систем [1]. При этом наибольший ущерб от злоупотребления алкоголем испытывает печень как основной орган детоксикации [2]. В печени осуществляется окисление этанола до ацетальдегида и уксусной кислоты, которые проявляют прямой цитотоксический эффект в отношении гепатоцитов при взаимодействии со структурными клеточными компонентами и активации перекисного окисления липидов. Этанол и его метаболиты нарушают метаболические процессы в печени, вызывая внутриклеточное накопление белков и липидов, и увеличивают продукцию активных форм кислорода, что сопровождается повреждением всех структур гепатоцитов, прежде всего мембран. Процесс метаболизма этанола в печени может происходить как неокислительным, так и окислительным путем [3].

Для предотвращения повреждения печени, вызванного этанолом, необходимы агенты, препятствующие окислительному стрессу. При лечении алкогольных интоксикаций используется большое разнообразие лекарственных средств, оказывающих гепатопротекторное и антиоксидантное действие. Одними из таких препаратов являются гептор (адemetионин) и мексидол (этилметилгидроксипиридина сукцинат), которые хорошо зарекомендовали себя в клинической практике [4, 5]. В то же время имеются данные, свидетельствующие о гепатопротекторной, антиоксидантной и антиоксидантной активности оксиметилурацила (5-гидрокси-6-метилурацил, ОМУ) и его производных [6].

Материалы и методы

Работа проведена на 70 самцах беспородных белых крыс весом 170–190 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при одинаковом уходе и питании. Крысы были разделены на следующие группы (по 14 особей в группе):

1. Контрольные животные, которым вводили дистиллированную воду.
2. Животные, которым внутрижелудочно вводили этанол в дозе 5 г/кг массы животного.
3. Животные, которым вводили этанол в дозе 5 г/кг и внутрибрюшинно гептор в дозе 72 мг/кг.
4. Животные, которым вводили этанол в дозе 5 г/кг и подкожно мексидол в дозе 50 мг/кг.
5. Животные, которым вводили этанол в дозе 5 г/кг и перорально ОМУ в дозе 50 мг/кг.

Препараты вводили за 1 час до введения этанола. Выведение животных из эксперимента осуществляли через 24 и 72 ч после введения этанола (по 7 особей в каждом временном интервале) путем

Для изучения механизма действия лекарственных средств, а также прогнозирования их эффективности может быть использован анализ изменения экспрессии генов под влиянием исследуемых фармакологических препаратов. Одним из важнейших представителей ферментативных антиоксидантов является Cu, Zn-зависимая супероксиддисмутаза (SOD1), которая расположена преимущественно в цитозоле, но небольшое ее количество присутствует в митохондриальном межмембранном пространстве [7]. Данный фермент, кодируемый геном *Sod1*, участвует в системе детоксикации супероксидных радикалов и обеспечивает защиту от окислительного стресса. Изменения активности SOD1 и экспрессии кодирующего ее гена были выявлены при различных заболеваниях, сопровождающихся активацией свободнорадикальных процессов [8, 9]. Считается, что такие антиоксидантные ферменты, как супероксиддисмутаза, принимающие непосредственное участие в детоксикации активных форм кислорода, необходимы для выживания клеток [10].

Несмотря на то, что были достигнуты значительные успехи в изучении механизмов алкогольных поражений печени и их фармакологической коррекции, необходимы дополнительные исследования с использованием экспериментальных моделей на животных для дальнейшего выяснения патофизиологии заболевания, а также для определения эффективных методов лечения и потенциальных биомаркеров [11]. Целью настоящей работы было изучение влияния гепатопротекторных препаратов на экспрессию гена *Sod1* у крыс с поражением печени этанолом.

декапитации под CO₂-наркозом, извлекали печень и замораживали в жидком азоте. Тотальную РНК выделяли из гомогенизированных образцов с помощью реагента ExtractRNA (ЗАО «Евроген», Россия) по протоколу производителя. Для синтеза кДНК использовали реактивы MMLV RT kit (ЗАО «Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в режиме реального времени проводили на приборе Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия) с использованием праймеров, синтезированных ЗАО «Евроген» (Россия). Обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия). В качестве референсного был выбран ген *Gapdh*.

Статистический анализ проводили с помощью стандартного пакета программ Statistics 21.0 (IBM, США). Для определения различий между группами применяли t-критерий Стьюдента. Для оценки различий критическим уровнем значимости принималось значение $p < 0,05$.

Результаты

На рисунке 1 представлены данные количественной оценки экспрессии гена *Sod1* в печени крыс через 24 часа после этаноловой интоксикации и на фоне гепатопротекторных препаратов, полученные методом ПЦР в реальном времени.

Как видно из рисунка, кратность экспрессии гена *Sod1* в печени через 24 ч практически не изменялась относительно контроля в ответ на введение животным этанола, составив $-0,03 \pm 0,43$ ($p > 0,05$).

Статистически значимое изменение транскрипционной активности исследуемого гена также не обнаружено под действием гепатопротекторных препаратов. Тенденция к небольшому снижению наблюдалась в отношении изменений экспрессии *Sod1* при применении гептора и мексидола, показатель составил $-0,16 \pm 0,25$ и $-0,37 \pm 0,79$ соответственно ($p > 0,05$). Тогда как под влиянием

ОМУ уровень экспрессии повысился, достигнув значения $0,83 \pm 0,23$ ($p = 0,731$).

Результаты исследований, приведенные на рисунке 2, показывают изменения профиля экспрессии гена *Sod1* в печени животных контрольной и опытных групп через 72 часа после этаноловой интоксикации и на фоне гепатопротекторных препаратов. Из полученных данных видно, что через 72 ч воздействие этанола сопровождалось уменьшением кратности экспрессии гена *Sod1* до $-1,61 \pm 0,16$ по сравнению с контрольной группой, однако отмеченные различия не достигли статистической значимости ($p = 0,123$).

Аналогичная тенденция к снижению транскрипционной активности гена *Sod1* наблюдалась в группах животных, получавших гептор, мексидол и ОМУ, уровень экспрессии составил соответственно $-1,76 \pm 0,38$, $-2,45 \pm 0,25$ и $-1,87 \pm 0,70$ ($p > 0,05$).

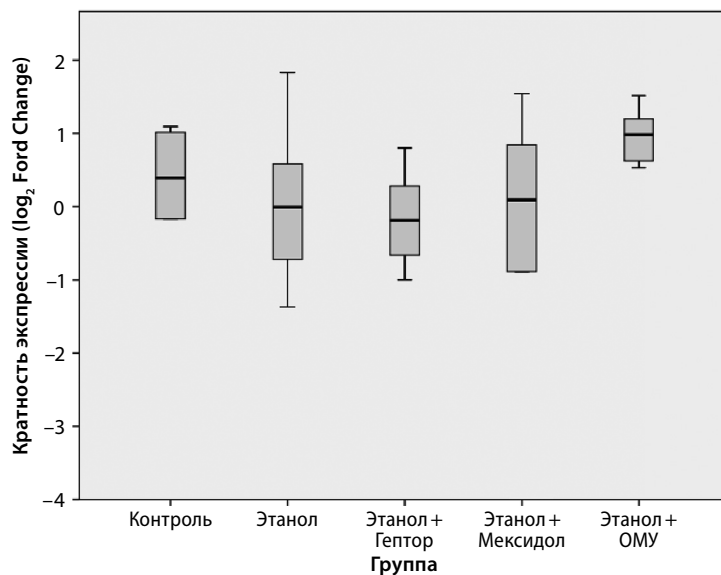


Рисунок 1.

Профиль экспрессии гена *Sod1* в печени крыс через 24 ч после этаноловой интоксикации на фоне гепатопротекторных препаратов

Figure 1.

Expression profile of the *Sod1* gene in rat liver 24 h after ethanol intoxication against the background of hepatoprotective drugs

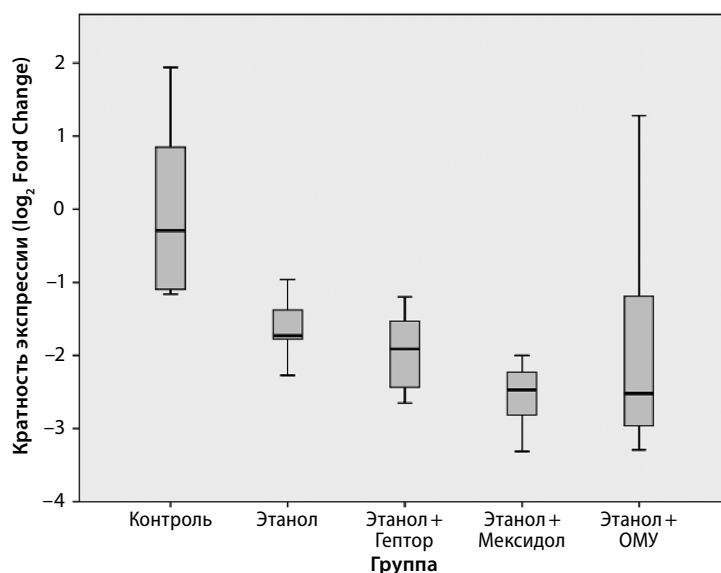


Рисунок 2.

Профиль экспрессии гена *Sod1* в печени крыс через 72 ч после этаноловой интоксикации на фоне гепатопротекторных препаратов

Figure 2.

Expression profile of the *Sod1* gene in rat liver 72 h after ethanol intoxication against the background of hepatoprotective drugs

Обсуждение

В результате проведенного нами исследования было показано отсутствие существенного изменения экспрессии гена *Sod1* в печени крыс через 24 часа после введения этанола по сравнению с контрольной группой. В то же время выявлено некоторое повышение уровня экспрессии данного гена под влиянием ОМУ. Активация экспрессии гена *Sod1* в печени крыс в ответ на воздействие ОМУ, возможно, предотвращает процессы, ведущие к повреждению клеток печени, в условиях интоксикации этанолом.

Также не было обнаружено статистически значимых различий в уровне экспрессии гена *Sod1* через 72 ч после воздействия этанола и на фоне лекарственных средств. Однако наблюдалась тенденция к снижению исследуемого показателя. В различных исследованиях были продемонстрированы противоречивые данные относительно воздействия этанола на активность SOD1. В ряде экспериментальных работ не было обнаружено существенных различий в активности SOD1 между группой крыс, получавшей этанол и контролем [12, 13]. В то же время результаты других исследований свидетельствуют о подавлении активности SOD1 в печени крыс в ответ на длительное введение этанола [14, 15]. Кроме того, анализ биопсийного материала больных

алкогольной болезнью печени показал уменьшение уровня экспрессии SOD1 [16]. Снижение активности супероксиддисмутазы в печени после обработки этанолом, вероятно, связано с повреждением молекул фермента и, следовательно, с уменьшением его эффективности. Согласно полученным ранее данным, хроническое потребление этанола вызывает повреждение печени у мышей с нокаутом гена *Sod1* [17]. При этом повышение экспрессии данного гена защищает печень от воздействия этанола. Так, показано, что опосредованная аденовирусом доставка гена *Sod1* предотвращает этанол-индуцированное повреждение печени у крыс [18].

Рассматривая возможные причины снижения транскрипционной активности гена *Sod1* при введении гепатопротекторов на фоне развития окислительного стресса, вызванного этанолом, можно предположить, что исследуемые препараты, нейтрализуя активные формы кислорода, уменьшают степень мобилизации ферментов антиоксидантной системы. Кроме того, уменьшение интенсивности окислительного стресса может способствовать снижению активности транскрипционного фактора Nrf2, который ответственен за индукцию экспрессии генов антиоксидантных ферментов, включая *Sod1* [19].

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение как этанола, так и профилактическое применение гепатопротекторных препаратов не приводило к существенным изменениям уровня экспрессии гена *Sod1* в печени крыс. Через 72 ч транскрипционная активность исследуемого гена имела тенденцию к снижению, позволяя предположить, что ферментативные системы антиоксидантной защиты могут быть нарушены у крыс, получавших

этанол. При этом усиливающийся окислительный стресс может способствовать патологическому повреждению печени. Регуляция активности антиоксидантных ферментов является сложным процессом и зависит от многих факторов, необходимы дополнительные исследования, направленные на выявление механизмов регуляции антиоксидантной системы, а также поиск лекарственных средств, влияющих на транскрипционную активность генов.

Литература | References

1. Zhou Y., Zheng J., Li S., et al. Alcoholic Beverage Consumption and Chronic Diseases. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2016;13(6):522. doi: 10.3390/ijerph13060522.
2. Polunina T. E. Alcoholic liver disease. *Farmateka*. 2019;26(2):106–114. (In Russ.) doi: 10.18565/farmateka.2019.2.106–114.
Полунина Т. Е. Алкогольные поражения печени. *Фарматека*. 2019;26(2):106–114. doi: 10.18565/farmateka.2019.2.106–114.
3. Kubiak-Tomaszewska G., Tomaszewski P., Pachecka J., et al. Molecular mechanisms of ethanol biotransformation: enzymes of oxidative and nonoxidative metabolic pathways in human. *Xenobiotica*. 2020;50(10):1180–1201. doi: 10.1080/00498254.2020.1761571.
4. Golovanova Ye. V. Experience of use of native hepatoprotector Heptor (ademetionine) in patients with alcoholic liver disease. *Farmateka*. 2010;12:82–87. (In Russ.)
Голованова Е. В. Опыт применения отечественного гепатопротектора Гептор (адеметинин) у больных алкогольной болезнью печени. *Фарматека*. 2010;12:82–87.
5. Pozhilova E. V., Novikov V. E., Novikova A. V. Pharmacodynamics and clinical applications of preparations based on hydroxypyridine. *Vestnik of the Smolensk State Medical Academy*. 2013;12(3):56–66. (In Russ.)
Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Новикова А. В. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина. *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. 2013;12(3):56–66.
6. Mushkin V. A., Repina E. F., Khusnutdinova N. Yu., et al. Antitoxic activity of pyrimidines (structure – activity). *Occupational health and human ecology*. 2018;4:117–123. (In Russ.)
Мышкин В. А., Репина Э. Ф., Хуснутдинова Н. Ю. и соавт. Антиоксическая активность пиримидинов (структура – активность). *Медицина труда и экология человека*. 2018;4:117–123.
7. Kawamata H., Manfredi G. Import, maturation, and function of SOD1 and its copper chaperone CCS in the mitochondrial intermembrane space. *Antioxid. Redox Signal*. 2010;13(9):1375–84. doi: 10.1089/ars.2010.3212.

8. Fukai T., Folz R. J., Landmesser U., Harrison D. G. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2002;55(2):239–49. doi: 10.1016/s0008-6363(02)00328-0.
9. Wang Y., Branicky R., Noë A., Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 2018;217(6):1915–1928. doi: 10.1083/jcb.201708007.
10. Inoue M., Sato E. F., Nishikawa M., et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 2003;10(23):2495–505. doi: 10.2174/0929867033456477.
11. Lamas-Paz A., Hao F., Nelson L. J., et al. Alcoholic liver disease: Utility of animal models. *World J. Gastroenterol.* 2018;24(45):5063–5075. doi: 10.3748/wjg.v24.i45.5063.
12. Yang S.C., Huang C. C., Chu J. S., Chen J. R. Effects of beta-carotene on cell viability and antioxidant status of hepatocytes from chronically ethanol-fed rats. *Br J Nutr.* 2004;92(2):209–15. doi: 10.1079/BJN20041190.
13. Samuhasaneeto S., Thong-Ngam D., Kulaputana O., et al. Curcumin decreased oxidative stress, inhibited NF-kappaB activation, and improved liver pathology in ethanol-induced liver injury in rats. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:981963. doi: 10.1155/2009/981963.
14. Farbiszewski R., Chwiecko M., Holownia A., Pawlowska D. The decrease of superoxide dismutase activity and depletion of sulfhydryl compounds in ethanol-induced liver injury. *Drug Alcohol Depend.* 1991;28(3):291–4. doi: 10.1016/0376-8716(91)90063-5.
15. Polavarapu R., Spitz D. R., Sim J. E., et al. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology.* 1998;27(5):1317–23. doi: 10.1002/hep.510270518.
16. Zhao M., Matter K., Laissue J. A., Zimmermann A. Copper/zinc and manganese superoxide dismutases in alcoholic liver disease: immunohistochemical quantitation. *Histol. Histopathol.* 1996;11(4):899–907.
17. Kessova I. G., Ho Y. S., Thung S., Cederbaum A. I. Alcohol-induced liver injury in mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. *Hepatology.* 2003;38(5):1136–45. doi: 10.1053/jhep.2003.50450.
18. Wheeler M. D., Kono H., Yin M., et al. Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Gastroenterology.* 2001;120(5):1241–50. doi: 10.1053/gast.2001.23253.
19. Espinosa-Diez C., Miguel V., Mennerich D., et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* 2015;6:183–197. doi: 10.1016/j.redox.2015.07.008.