
doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.07.096>

УДК 577.218

Т.В. Марчишак, Т.Г. Яковенко, З.Ю. Ткачук

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ

E-mail: biochem.imbg@gmail.com, ztkachuk@gmail.com

Вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом на експресію генів при гострій тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності

Представлено членом-кореспондентом НАН України М. А. Тукалом

Досліджено вплив комплексів олігорибонуклеотидів з D-манітолом (ОРН–D-M) на експресію мРНК генів IL-6, TNF- α , TGF- β 1 та COL1A1 при гострій гепатотоксичності. Показано, що введення комплексів ОРН–D-M знижує експресію мРНК прозапальних цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин α (TNF- α) та інтерлейкін-6 (IL-6), профібrogenного цитокіну – трансформуючого фактору росту β 1 (TGF- β 1), а також основного білка позаклітинного матриксу – колагену I (COL1A1) при гострій гепатотоксичності. Отримані результати вказують на те, що комплекси ОРН–D-M здатні модулювати експресію прозапальних та профібrogenних факторів, що задіяні у розвитку патологічного процесу.

Ключові слова: комплекси ОРН–D-M, тіоацетамід-індукована гепатотоксичність, експресія мРНК генів.

Печінка є основним метаболічним органом, у якому інтегровані всі найважливіші біохімічні процеси, необхідні для підтримки гомеостазу організму. Будучи детоксикуючим органом, вона першою контактує з ксенобіотиками, дія яких спричиняє серйозні порушення метаболізму, що призводить до розвитку патологічного процесу [1]. Гостре токсичне ураження печінки характеризується пошкодженням мембран, окиснювальним стресом, масивним некрозом гепатоцитів, інфільтрацією паренхіми нейтрофілами та активацією стелатних клітин печінки, що зумовлює посилення запалення та пошкодження печінки [2]. Показано, що в запаленні пусковими молекулами виступають такі прозапальні медіатори, як фактор некрозу пухлин α (TNF- α), циклооксигеназа 2 та інтерлейкін 6 (IL-6), які запускають каскад цитокінів, що опосередковують запальні реакції [3]. Однією з ключових подій гострої гепатотоксичності є активація стелатних клітин печінки, яка здійснюється прозапальними цитокінами. Активовані стелатні клітини (міофібробластного типу) характеризуються високим рівнем проліферації, міграції та скорочуваності [4]. Ці клітини здатні експресувати основний профібrogenний фактор – трансформуючий фактор росту β 1 (TGF- β 1). Крім цього, активовані стелатні клітини печінки надекспресують компоненти позаклітинного матриксу – колаген I та III, ламінін. Це призводить до відкладення колагену, що сприяє розвитку фіброзу печінки [5].

© Т.В. Марчишак, Т.Г. Яковенко, З.Ю. Ткачук, 2018

Антисмислові РНК, аптамери та модифіковані нуклеїнові кислоти знайшли своє застосування в лікуванні захворювань печінки, впливаючи на зв'язування або зв'язуючись з відповідними таргетними молекулами. Антисмислові нуклеотиди, спрямовані проти мРНК *TNF- α* та *TGF- β 1*, здатні ефективно запобігати пошкодженню печінки під дією токсичних речовин [6, 7].

Природні та синтетичні олігорибонуклеотиди характеризуються широким спектром біологічної активності, включаючи стимуляцію процесів клітинного метаболізму з активацією синтезу ендогенних нуклеїнових кислот, специфічних регуляторних білків та ферментів, підвищення мітотичної активності клітин, стимуляцію репаративних процесів та стимуляцію синтезу АТР [8]. Тому, враховуючи широкий спектр біологічної активності олігорибонуклеотидів, а також розглядаючи печінку як орган-мішень у корекції патологій, ми ставили за мету дослідити вплив комплексів ОРН–D-M на експресію прозапальних та профіброзних цитокінів при гострій тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на мишах лінії C57BL6/J з початковою масою 18–25 г та віком 2,5–3 місяці. Утримання тварин та маніпуляції з ними проводили згідно з положеннями статті 26 Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 «Про захист тварин від жорстокого поводження», «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених 20.09.2001 Першим Українським національним конгресом з біоетики, та з урахуванням положень, викладених у NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Як модель токсичного ураження печінки використано тіоацетамід-індуковану гепатотоксичність. Гостре токсичне ураження печінки індукували одноразовим інтраперитонеальним введенням тіоацетаміду (ТАА) у дозі 500 мг/кг маси тіла тварини. На початку дослідження тварини були поділені на чотири групи (по 8 особин у кожній): I (контроль) – тварини, які отримували фізіологічний розчин (0,9 % NaCl) кожні 12 год; II (дослідний контроль I) – тварини, яким вводили одноразово інтраперитонеально розчин ТАА в дозі 500 мг/кг маси тіла; III (дослід) – тварини, яким вводили одноразово інтраперитонеально розчин тіоацетаміду в дозі 500 мг/кг маси тіла та перорально розчин комплексів ОРН–D-M у дозі 200 мг/кг тварини кожні 12 год протягом наступних 48 год; IV (дослідний контроль II) – тварини, яким вводили перорально розчин комплексів ОРН–D-M у дозі 200 мг/кг тварини кожні 12 год протягом наступних 48 год.

Евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом на 48-му год після введення гепатотоксину.

Виділення тотальної РНК здійснювали з використанням NucleoMag RNA відповідно до протоколу виробника. Кількість виділеної РНК і наявність у ній домішок білків і вуглеводів визначали за оптичною густиною розчинів при 260 нм і за співвідношенням A260/A280 за допомогою спектрофотометра Nanodrop, цілісність РНК – за співвідношенням інтенсивності смуг 28S/18S рРНК на електрофореграмі після електрофорезу на приладі Multina. Синтез кДНК проводили в кінцевому об'ємі 20 мкл з концентрацією тотальної РНК 2 мкг з використанням Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Реакцію зворотної транскрипції здійснювали на приладі Bio Rad 8000 з параметрами реакції: 42 °C 60 хв, 25 °C 5 хв, 42 °C 60 хв, 70 °C 5 хв.

Кількісну оцінку транскрипції мРНК генів *IL-6*, *TNF- α* , *TGF- β 1* та *COL1A1* виконували методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі на приладі CFX 96 Real-Time System (BioRad) з використанням програмного забезпечення BioRad CFX Manager. Ампліфікацію проводили у режимі: 95 °C 10 хв, 39 циклів: 95 °C 40 с, 60 °C 30 с, 72 °C 30 с, включаючи сканування планшета. Для нормалізації експресії мРНК геном «домашнього господарства» було вибрано *GAPDH*. Для розрахунку відносної експресії використовувати метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Праймери, які були використані для кількісного аналізу експресії мРНК наведені в таблиці.

Результати піддавали статистичній обробці за допомогою програми Microsoft Excel. Дані досліджень обробляли статистично з вирахуванням середніх арифметичних величин та відхилення середнього арифметичного між показниками. Достовірність різниці між групами тварин оцінювали з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Різниці вважали достовірними при $P \leq 0,05$.

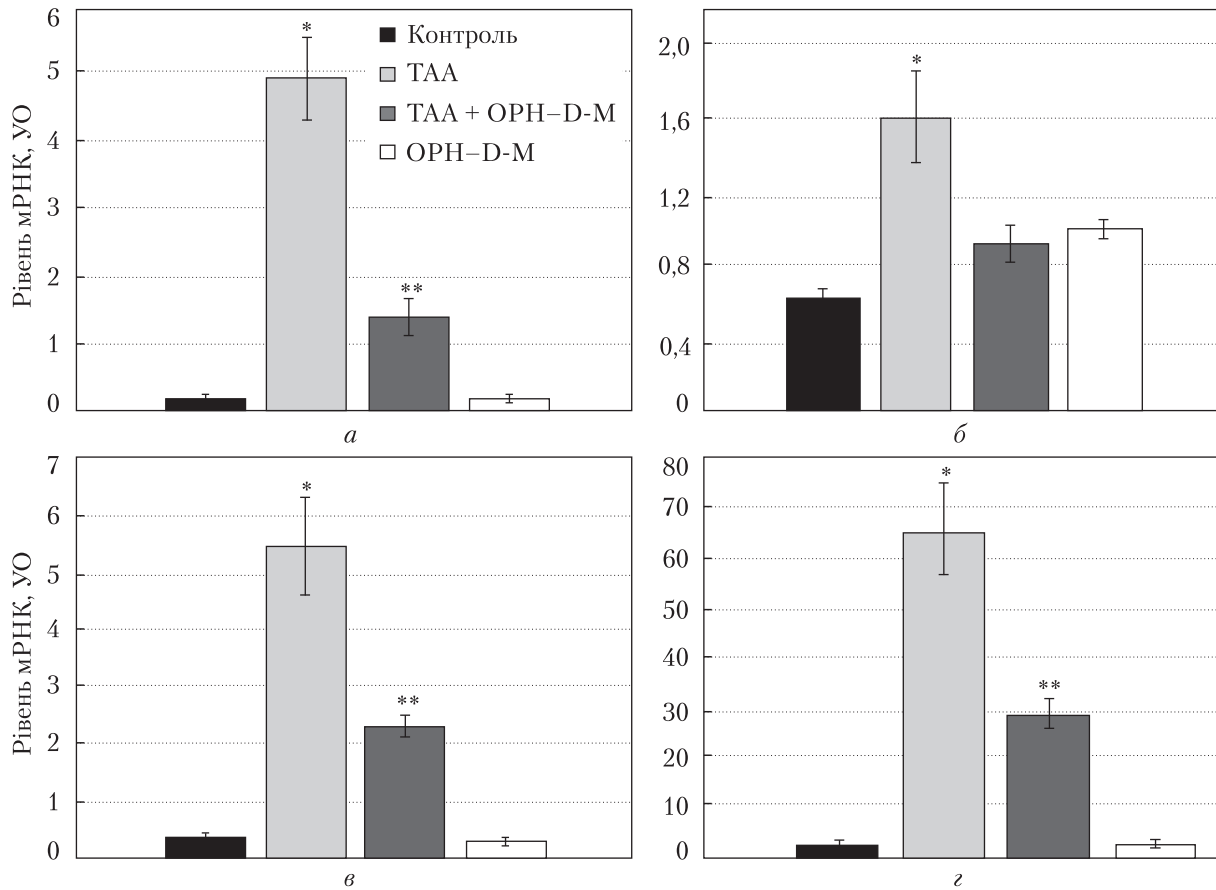
Результати та їх обговорення. Результати досліджень показали, що введення комплексів ОРН—D-M у дозі 200 мг/кг маси тіла через 12-годинні інтервали сприяло атенуації гепатотоксичного ефекту, викликаного однократним введенням ТАА в дозі 500 мг/кг, у тварин на 48 год експерименту (рисунок). Застосування комплексів ОРН—D-M з лікувальною метою сприяло зниженню рівня мРНК гена *TNF- α* на 71 % (див. рисунок, *а*) порівняно з групою дослідного контролю I (група II, тварини які отримували лише ТАА), в якій цей показник перевищував значення тварин контрольної групи (група I) майже у 30 разів (див. рисунок, *а*). Водночас показник рівня мРНК гена *IL-6* статистично достовірно не відрізнявся від показників контрольної групи (див. рисунок, *б*), що свідчить про атенуацію запального процесу в паренхімі печінки. Згідно з даними літератури, *TNF- α* виступає важливим медіатором запалення, який здатний модулювати ефекти інших цитокінів, наприклад *IL-6* [9]. *IL-6* у свою чергу є прозапальним цитокіном, ініціюючи гострофазну відповідь. Зниження експресії мРНК генів *TNF- α* та *IL-6* під дією комплексів ОРН—D-M при гострій гепатотоксичності свідчить про зменшення рівня активації клітин Купфера та інфільтрації печінки клітинами імунної системи. Тому, можливо, комплекси ОРН—D-M мають протизапальні ефекти, інгібуючи експресію таких прозапальних цитокінів, як *TNF- α* та *IL-6*.

Хронічне або важке запалення може стимулювати фібротичну відповідь, що характеризується незворотним зниженням функцій печінки та надмірним осадженням білків позаклітинного матриксу [10].

Нуклеотидні послідовності праймерів

Праймер	Нуклеотидна послідовність
<i>IL-6_for</i>	5'-GTCACAGAAGGAGTGCC
<i>IL-6_rev</i>	5'-CTGACCACAGTGAGGAA
<i>TNF-α_for</i>	5'-CCTCCCTCTCATCAGTTCTA
<i>TNF-α_rev</i>	5'-CTTTGAGATCCATGCCG
<i>TGF-β1_for</i>	5'-GGCTACCATGCCAACTT
<i>TGF-β1_rev</i>	5'-ACCCACGTAGTAGACGA
<i>COL1A1_for</i>	5'-CCTCAGAAGAAGTGGTACATCA
<i>COLA1_rev</i>	5'-GGCCTCGGTGGACATTA
<i>GAPDH_for</i>	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTC
<i>GAPDH_rev</i>	5'-TGGGTGGAATCATATTGGAACAT

зується незворотним зниженням функцій печінки та надмірним осадженням білків позаклітинного матриксу [10]. Активація стелатних клітин печінки є центральною подією в розвитку фіброзу, оскільки саме ці клітини виступають основним джерелом компонентів позаклітинного матриксу [11]. Стелатні клітини міофібробластного типу здатні до надпродукції позаклітинного матриксу, включаючи колаген I та III, гіалуронову кислоту та ламінін, знижуючи активність колагенази та деградації колагену, що призводить



Відносний рівень мРНК *TNF-α* (а), *IL-6* (б), *TGF-β1* (в) та *COL1A1* (г), в паренхімі печінки при гострій тіоацетамід-індукованій гепатотоксичності. Рівень мРНК *TNF-α*, *IL-6*, *TGF-β1* та *COL1A1* визначено на 48-му год після інтраперитонеального введення фізіологічного розчину, тіоацетаміду та перорального введення комплексів ОРН–D-M; величини, позначені різними індексами (*, **), статистично достовірно відрізняються, $P < 0,05$; $n = 8$

до дисбалансу між синтезом та деградацією позаклітинного матриксу [12]. Важливу роль у розвитку фіброзу відіграє *TGF-β1*, який є основним профіброгенним цитокином, що синтезується переважно стелатними клітинами міофібробластичного типу [13]. Рівень мРНК гена *TGF-β1* може вказувати на ступінь запалення, некрозу та фіброзу в ураженій паренхімі печінки гепатотоксином. Тому наступним етапом роботи було дослідження експресії мРНК гена *TGF-β1*. Результати проведених досліджень показали підвищення експресії цього гена у 14,7 раза в групі дослідного контролю I порівняно з контрольною групою тварин (див. рисунок, в). Застосування комплексів ОРН–D-M сприяло зниженню рівня мРНК *TGF-β1* на 57,3 % порівняно з групою, що отримувала гепатотоксин, проте досягнення контрольних значень (група I) не відбувалося.

Додатково було досліджено експресію мРНК гена *COL1A1*, який також експресується активованими стелатними клітинами. Виявлено значну індукцію мРНК *COL1A1* у 27,5 раза в групі тварин, які отримували одноразову ін'єкцію ТАА, порівняно з контрольною групою

(див. рисунок, з). Аналіз рівня мРНК *COL1A1* показав зниження експресії цього гена на 56 % у разі застосування комплексів ОРН—D—M при гострій гепатотоксичності.

Таким чином, на моделі гострої гепатотоксичності встановлено, що комплекси ОРН—D—M інгібують гепатоцелюлярні пошкодження печінки. Комплекси ОРН—D—M виявляють протизапальні та протифіброзні ефекти, модулюючи експресію деяких сигнальних молекул, що залучені у розвитку гепатотоксичності. Крім цього, можна припустити, що ці комплекси можуть виступати антифіброгенними агентами при хронічних захворюваннях печінки.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Pandit A., Sachdeva T., Bafna P. Drug-induced hepatotoxicity: A review. *J. App. Pharm. Sci.* 2012. **2**, Iss. 5. P. 233–243.
2. Luo M., Dong L., Li J., Wang Y., Shang B. Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. **8**, № 8. P. 8990–8996.
3. Hermenean A., Mariasiu T., Navarro-González I., Vegara-Meseguer J., Miutescu E., Chakraborty S., Pérez-Sánchez H. Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- α in chemically-induced acute liver damage: An in vivo study and molecular modeling. *Exp. Ther. Med.* 2017. **13**, № 5. P. 1671–1680.
4. Friedman S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* 2000. **275**, № 4. P. 2247–2250.
5. Higashi T., Friedman S.L., Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. **121**. P. 27–42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
6. Ponnappa B., Israel Y., Aini M., Zhou F., Russ R., Cao Q., Hu Y., Rubin R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem. Pharmacol.* 2005. **69**, № 4. P. 569–577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.11.011>
7. Doh K., Jung H., Moon I., Kang H., Park J., Park J. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by ribbon antisense to transforming growth factor- β 1. *Int. J. Mol. Med.* 2008. **21**, № 1. P. 33–39. doi: <https://doi.org/10.3892/ijmm.21.1.33>
8. Шаповалова І.О. Вплив комбінації нуклеїнату та α -токоферолу на функціональні проби печінки у хворих на хронічний токсичний гепатит, сполучений з хронічним некалькульозним холециститом та ожирінням. *Укр. морф. альманах.* 2011. **9**, № 1. С. 155–158.
9. Pinzani M., Macias-Barragan J. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010. **4**, № 4. P. 459–472. doi: <https://doi.org/10.1586/egh.10.47>
10. Wang F., Liu S., Du T., Chen H., Li Z., Yan J. NF- κ B inhibition alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cells. *Exp. Ther. Med.* 2014. **8**, № 1. P. 95–99. doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1682>
11. Friedman S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008. **134**, № 6. P.1655–1669. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>
12. Wang T., Wu D., Li P., Zhang K., Tao S., Li Z., Li J. Effects of Taohongsiwu decoction on the expression of α -SMA and TGF- β 1 mRNA in the liver tissues of a rat model of hepatic cirrhosis. *Exp. Ther. Med.* 2017. **14**, № 2. P. 1074–1080. doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4625>
13. Friedman S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.* 2008. **88**, № 1. P. 125–172. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>

Надійшло до редакції 13.03.2018

REFERENCES

1. Pandit, A., Sachdeva, T. & Bafna, P. (2012). Drug-induced hepatotoxicity: A review. *J. App. Pharm. Sci.*, 2, Iss. 5, pp. 233-243.
2. Luo, M., Dong, L., Li, J., Wang, Y. & Shang, B. (2015). Protective effects of pentoxifylline on acute liver injury induced by thioacetamide in rats. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, No. 8, pp. 8990-8996.

- Hermenean, A., Mariasiu, T., Navarro-González, I., Vegara-Meseguer, J., Miutescu E., Chakraborty, S. & Pérez-Sánchez, H. (2017). Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- α in chemically-induced acute liver damage: An in vivo study and molecular modeling. *Exp. Ther. Med.*, 13, No. 5, pp. 1671-1680.
- Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J. Biol. Chem.*, 275, No. 4, pp. 2247-2250.
- Higashi, T., Friedman, S. L. & Hoshida, Y. (2017). Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 121, pp. 27-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.007>
- Ponnappa, B., Israel, Y., Aini, M., Zhou, F., Russ, R., Cao, Q., Hu, Y. & Rubin, R. (2005). Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem. Pharmacol.*, 69, No. 4, pp. 569-577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.11.011>
- Doh, K., Jung, H., Moon, I., Kang, H., Park, J. & Park, J. (2008). Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by ribbon antisense to transforming growth factor- β 1. *Int. J. Mol. Med.*, 21, No. 1, pp. 33-39. doi: <https://doi.org/10.3892/ijmm.21.1.33>
- Shapovalova, I. A. (2011). Influence of nucleinas and α -tokopherol combination on liver functional tests of the patients with chronic toxic hepatitis, combined with a chronic uncalculosis cholecystitis on background obesity. *Ukr. Morp. Alm.*, 9, No. 1, pp. 155-158 (in Ukrainian).
- Pinzani, M. & Macias-Barragan, J. (2010). Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 4, No. 4, pp. 459-472. doi: <https://doi.org/10.1586/egh.10.47>
- Wang, F., Liu, S., Du, T., Chen, H., Li, Z. & Yan, J. (2014). NF- κ B inhibition alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via suppression of activated hepatic stellate cells. *Exp. Ther. Med.*, 8, No. 1, pp. 95-99. doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1682>
- Friedman, S. L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 134, No. 6, pp. 1655-1669. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.03.003>
- Wang, T., Wu, D., Li, P., Zhang, K., Tao, S., Li, Z. & Li, J. (2017). Effects of Taohongsiwu decoction on the expression of α -SMA and TGF- β 1 mRNA in the liver tissues of a rat model of hepatic cirrhosis. *Exp. Ther. Med.*, 14, No. 2, pp. 1074-1080. doi: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4625>
- Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol. Rev.*, 88, No. 1, pp. 125-172. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>

Received 13.03.2018

Т.В. Марчишак, Т.Г. Яковенко, З.Ю. Ткачук

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев
E-mail: biochem.imbg@gmail.com, ztkachuk@gmail.com

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ ОЛИГОРИБОНУКЛЕОТИДОВ С D-МАННИТОЛОМ НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРИ ОСТРОЙ ТИОАЦЕТАМИД-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ

Исследовано влияние комплексов олигорибонуклеотидов с D-маннітолом (ОРН–D–М) на експресію мРНК генів *IL-6*, *TNF- α* , *TGF- β 1* і *COL1A1* при гострій гепатотоксичності. Показано, що введення комплексів ОРН–D–М знижує експресію мРНК провоспалительних цитокінів, таких як фактор некроза опухолей α (*TNF- α*) і інтерлейкін-6 (*IL-6*), профіброгенного цитокіну – трансформуючого фактора росту β 1 (*TGF- β 1*), а також основного білка внеклеточного матрикса – колагену I (*COL1A1*) при гострій гепатотоксичності. Отримані результати вказують на те, що комплекси ОРН–D–М здатні модулювати експресію провоспалительних і профіброзних факторів, учасників у розвитку патологічного процесу.

Ключевые слова: комплексы ОРН–D–М, тиоацетамид-индуцированная гепатотоксичность, экспресия мРНК генов.

T.V. Marchyshak, T.G. Yakovenko, Z.Yu. Tkachuk

Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Kiev

E-mail: biochem.imbg@gmail.com, ztkachuk@gmail.com

INFLUENCE OF OLIGORIBONUCLEOTIDES-D-MANNITOL COMPLEXES
ON THE EXPRESSION OF GENES UNDER ACUTE THIOACETAMIDE-INDUCED
HEPATOTOXICITY

The effect of oligoribonucleotides-D-mannitol complexes on the expression of *IL-6*, *TNF- α* , *TGF- β 1*, and *COL1A1* mRNA genes under acute hepatotoxicity has been investigated. It is shown that the administration of ORNs–D-M complexes results in the downregulation of genes encoding pro-inflammatory cytokines, including the tumor necrosis factor α (*TNF- α*) and interleukin-6 (*IL-6*), profibrogenic cytokine *TGF- β 1*, as well as the predominant protein of hepatic extracellular matrix – collagen I (*COL1A1*). The obtained results indicate that ORN–D-M complexes can modulate the expression of pro-inflammatory and profibrogenic genes involved in the development of the pathological process.

Keywords: *ORN–D-M complexes, thioacetamide-induced hepatotoxicity, expression of mRNA genes.*