

УДК 615.917:575.2

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДЕМЕТИОНИНА И ПРОИЗВОДНОГО УРАЦИЛА В КОРРЕКЦИИ ИЗМЕНЕНИЙ КРАТНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПОЧКАХ КРЫС ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ТИОАЦЕТАМИДА

¹Рябова Ю.В., ¹Смолянкин Д.А., ¹Каримов Д.Д.,
¹Кудояров Э.Р., ¹Якупова Т.Г., ¹Репина Э.Ф., ^{1,2}Каримов Д.О.

¹ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда
и экологии человека», Уфа, e-mail: fbun@uniimtech.ru;

²ФГБНУ «Национальный научно-исследовательский институт
общественного здоровья имени Н.А. Семашко», Москва

Цель исследования – оценить влияние адеметионина и комплекса 5-гидроксн-6-метилурацила с ацетилцистеином на экспрессию генов антиоксидантного ответа (*Hmox1*, *Nqo1*) в почечной ткани крыс при хроническом воздействии тиацетамида. Экспериментальное моделирование было осуществлено на 56 аутбредных крысах-самцах, разделенных на четыре группы: положительный контроль, отрицательный контроль, две группы токсического воздействия на фоне коррекции разными агентами. В качестве токсиканта использовали тиацетамид в дозе 50 мг/кг массы тела. В качестве коррекционных препаратов были выбраны адеметионин и комплексное соединение 5-гидроксн-6-метилурацила с ацетилцистеином. Изменение транскрипционной активности генов оценивали через 50 и 100 дней от начала воздействия методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ген *Gapdh* использовали в качестве внутреннего контроля. Статистическую обработку данных проводили с использованием бутстрап-анализа. Согласно результатам исследования, хроническое воздействие тиацетамида в изученных дозах не сопровождается выраженной активацией генов антиоксидантного ответа в почечной ткани. На 50-й день достоверное повышение экспрессии *Nqo1* отмечено только при коррекции адеметионином, тогда как *Hmox1* демонстрирует снижение к 100-му дню, отражая истощение компенсаторных механизмов. Различия в динамике экспрессии указывают на разный механизм действия коррекционных средств и подчеркивают важность выбора целевой точки фармакологической коррекции.

Ключевые слова: экспрессия генов, *Hmox1*, *Nqo1*, эксперимент, почки, тиацетамид

EFFICACY OF ADEMETIONINE AND URACIL-DERIVED COMPOUND IN CORRECTING CHANGES IN THE EXPRESSION OF ANTIOXIDANT DEFENSE GENES IN THE KIDNEYS OF RATS UNDER CHRONIC THIOACETAMIDE EXPOSURE

¹Ryabova Yu.V., ¹Smolyankin D.A., ¹Karimov D.D.,
¹Kudoyarov E.R., ¹Yakupova T.G., ¹Repina E.F., ^{1,2}Karimov D.O.

¹Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa,
e-mail: fbun@uniimtech.ru;

²National Research Institute of Public Health named after N.A. Semashko, Moscow

Objective: to evaluate the effects of ademetionine and a compound of 5-hydroxy-6-methyluracil with acetylcysteine on the expression of antioxidant response genes (*Hmox1*, *Nqo1*) in the renal tissue of rats under chronic thioacetamide exposure. Experimental modeling was performed on 56 outbred male rats randomly assigned to four groups: positive control, negative control, and two thioacetamide-exposed groups with different corrective treatments. Thioacetamide was administered at a dose of 50 mg/kg body weight. Ademetionine and a complex of 5-hydroxy-6-methyluracil with acetylcysteine were selected as corrective agents. Transcriptional activity of the target genes was evaluated on days 50 and 100 using real-time quantitative PCR. *Gapdh* was used as a housekeeping gene. Statistical analysis was performed using bootstrap methods. Chronic exposure to thioacetamide at the studied dose did not result in marked activation of antioxidant response genes in renal tissue. On day 50, a significant increase in *Nqo1* expression was observed only in the ademetionine-treated group, whereas *Hmox1* expression decreased by day 100, indicating depletion of compensatory mechanisms. Differences in expression dynamics suggest distinct modes of action for the corrective agents and highlight the importance of selecting the appropriate molecular targets for pharmacological intervention.

Keywords: gene expression, *Hmox1*, *Nqo1*, experimental model, kidneys, thioacetamide

Введение

Тиацетамид (ТАА) представляет собой сероорганическое соединение, которое не встречается в природе, является искусственно созданным веществом и активно применяется в различных сферах челове-

ческой деятельности. ТАА широко используется в качественном неорганическом анализе в качестве источника сульфид-ионов, что позволяет получать сульфиды металлов при взаимодействии с водными растворами таких катионов металлов, как никель,

свинец и ртуть. Его применяют в качестве стабилизатора моторного топлива и ускорителя вулканизации каучука, в кожевенной, текстильной и бумажной промышленности. ТАА ранее также применялся в качестве фунгицида, в настоящее время широко используется в экспериментальной токсикологии как модельное соединение, способное вызывать повреждение печени и других органов [1]. Токсичность ТАА обусловлена его метаболическим превращением в печени с участием цитохрома P450 до высоко-реактивных метаболитов – тиацетамид-S-оксида и тиацетамид-S-диоксида. Эти метаболиты проявляют цитотоксическое действие как за счет ковалентного связывания с макромолекулами, так и посредством индуцированного оксидативного стресса, сопровождающегося генерацией свободных радикалов и истощением антиоксидантных систем защиты. Реактивные метаболиты тиацетамида оказывают токсическое действие посредством двух основных механизмов: прямого взаимодействия с клеточными макромолекулами (образуя ковалентные аддукты с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами) и опосредованного воздействия через индукцию оксидативного стресса. Последний сопровождается массивной генерацией свободных радикалов, истощением антиоксидантных систем [2]. При этом даже однократное воздействие ТАА способно инициировать повреждение печени и нарушение ее детоксикационной функции, что влечет за собой системное распространение токсических соединений, включая аммиак, обладающий нефротоксичностью [3]. Кроме того, кинетика образования и накопления метаболитов ТАА характеризуется насыщенностью и значительной индивидуальной вариабельностью, что затрудняет прогнозирование степени и направленности органных повреждений [4].

Почки, играя ключевую роль в элиминации метаболитов и поддержании гомеостаза, становятся уязвимыми мишенями при нарушении функции печени и системной оксидативной нагрузке. Острые и хронические поражения почек, развивающиеся на этом фоне, ассоциированы с высоким риском инвалидизации и летального исхода [5, 6]. В настоящем исследовании авторы сосредоточились на оценке потенциальных терапевтических стратегий, направленных на коррекцию почечных нарушений при остром воздействии модельного токсиканта. Одним из перспективных направлений является использование средств с антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами, способных эффективно вмешиваться в патогенетические механизмы токсическо-

го действия на клеточном уровне. В частности, адеметионин (S-аденозилметионин) и комбинация 5-гидрокси-6-метилурацила с ацетилцистеином могут потенциально модулировать экспрессию генов антиоксидантной защиты и снижать выраженность тканевого окислительного стресса.

Цель исследования – оценить влияние адеметионина и комплекса 5-гидрокси-6-метилурацила с ацетилцистеином на экспрессию генов антиоксидантного ответа (*Hmox1*, *Nqo1*) в почечной ткани крыс при хроническом воздействии тиацетамида

Материалы и методы исследования

Исследование было спланировано с учетом международных рекомендаций ARRIVE по гуманному использованию лабораторных животных. Протокол эксперимента утвержден локальным биоэтическим комитетом (решение № 01-02 от 08.02.2024) и полностью соответствовал нормативным требованиям РФ к работе с экспериментальными животными.

56 аутбредных крыс-самцов массой 170–190 г (возраст 12–14 недель) содержались в стандартных условиях вивария. Температурный режим поддерживался на уровне 21–26 °С, животные содержались при 12-часовом световом цикле с автоматическим переключением. Был обеспечен свободный доступ к воде и стандартному корму для лабораторных животных. Перед началом эксперимента животные прошли 5-дневную акклиматизацию.

Животные были рандомизированы на четыре группы (n = 14 для каждой группы). Первая группа являлась положительным контролем и получала раствор тиацетамида (ТАА) в дозе 50 мг/кг массы тела. Вторая и третья группы получали аналогичное токсическое воздействие на фоне коррекции – адеметионина в виде лекарственного препарата «Самеликс», (ООО Фирма «Фермент», Россия) в разовой дозе 25 мг/кг массы тела за 1 ч до ТАА (ТАА + С); либо экспериментального комплексного соединения 5-гидрокси-6-метилурацила с ацетилцистеином в разовой дозе 500 мг/кг массы тела, разработанного Уфимским институтом химии Российской академии наук [7]. Четвертая группа являлась отрицательным контролем и получала эквивалентный объем физиологического раствора (К). Продолжительность эксперимента составила 100 дней с промежуточным контролем на 50-й день.

По окончании эксперимента животных подвергали эвтаназии путем декапитации. Почечную ткань забирали немедленно после эвтаназии для последующего

молекулярно-генетического анализа. РНК выделяли из тканевых образцов органа с использованием набора ExtractRNA («Евроген», Россия) в строгом соответствии с инструкциями производителя. Синтез кДНК осуществляли с применением набора реактивов MMLV RT kit и праймеров олиго(dT)15 («Евроген», Россия). Для исследования транскрипции генов использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, при котором применяли специфичные олигонуклеотидные праймеры и интеркалирующий краситель SYBR Green. Ген *Gapdh* служил внутренним контролем. Для оценки относительной экспрессии генов использовался метод, предложенный K.J. Livak и T.D. Schmittgen [8]. Для определения разницы между группами рассчитывался показатель $\Delta\Delta CT$, который представлял собой разность между средним значением ΔCT группы сравнения и группы контроля. Результирующее значение, полученное посредством экспоненциального преобразования этой разности, интерпретировалось как «fold change» (FC), что позволяло оценить, насколько изменена экспрессия целевого гена в исследуемой группе относительно контроля. Были выбраны ген, кодирующий гем-оксигеназа 1 (*Hmox1*), который считается одним из наиболее чувствительных и надежных индикаторов клеточного окислительного стресса (идентификатор гена согласно NCBI: 24451) [9]. Изучали уровень экспрессии гена, кодирующего NAD(P)H-хиноноксидоредуктазу 1 (*Nqo1*) – ключевой фермент детоксикации, играет важную роль в хемотропекции, катализирующий восстановление хинонов и участвующий в антиоксидантной защите посредством генерации восстановленных форм убихинона и витамина Е (идентификатор гена согласно NCBI: 24314) [10].

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 21.0 (IBM, USA). В качестве критерия нормальности распределения признаков в изучаемых группах использовали критерий Колмогорова – Смирнова. При нормальном распределении данных для оценки значимости различий между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорные критерии Тьюки и Тамхейна. Данные представлены как среднее арифметическое и стандартная ошибка. Статистический анализ данных проводился с использованием метода бутстрап (Bootstrap), что обеспечивало надежность и воспроизводимость результатов через многократную генерацию выборок методом Монте-

Карло. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В отличие от хорошо изученных гепатотоксических эффектов, нефротоксическое действие ТАА остается менее исследованным. При длительном воздействии описаны гломерулярные нарушения, застойные явления, повышение уровней креатинина и мочевины, а также активация провоспалительных и оксидативных путей [11, 12]. Однако молекулярные механизмы этих изменений, особенно в условиях хронической нагрузки, остаются недостаточно ясными, что обуславливает актуальность оценки экспрессии антиоксидантных генов в почечной ткани.

Выбор генов *Hmox1* и *Nqo1* в качестве маркеров клеточного ответа обусловлен их ключевой ролью в системе антиоксидантной защиты. *Hmox1* кодирует гемоксигеназу-1 – чувствительный индикатор оксидативного стресса, *Nqo1* – фермент второй фазы детоксикации, участвующий в восстановлении хинонов и защите от реактивных метаболитов [9, 10]. Оба гена используются как универсальные маркеры включения клеточной защиты при воздействии ксенобиотиков.

Полученные в проведенном исследовании результаты демонстрируют ограниченную реактивность антиоксидантных генов в почках на фоне хронического воздействия ТАА. Как видно на рис. 1, на 50-й день воздействия кратность экспрессии гена *Nqo1* в ткани почек крыс статистически значимо не отличалась между контрольной группой и группой ТАА ($-7,26 \pm 0,28$ против $-7,17 \pm 0,09$; $p = 0,783$). Однако при сопоставлении группы ТАА с группой ТАА + Самеликс было зафиксировано достоверное повышение экспрессии *Nqo1* ($-7,17 \pm 0,09$ против $-6,82 \pm 0,09$; $p = 0,047$), что согласуется с известным эффектом адеметионина на метаболизм глутатиона и метилирование промоторов антиоксидантных генов [13, 14]. В группе ТАА + М уровень экспрессии не отличался от контроля и от ТАА ($p > 0,05$), что может быть связано с реализацией эффекта комплекса 5-гидрокси-6-метилурацила с ацетилцистеином в обход транскрипционной активации Nrf2, за счет прямого донорства SH-групп или непрямого модулирования репаративных путей [15]. На 100-й день воздействия статистически значимых изменений экспрессии *Nqo1* ни в одной из групп по сравнению с контролем выявлено не было ($p > 0,05$).



Рис. 1. Изменение кратности экспрессии гена *Ngol* в ткани почек крыс при субхроническом (50 дней) и хроническом (100 дней) воздействии ТАА и на фоне фармакологической коррекции. По оси ординат – относительная кратность экспрессии (нормализована к *Gapdh*), по оси абсцисс – экспериментальные группы. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой отрицательного контроля (К) соответствующего временного периода; # – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой ТАА соответствующего временного периода. Белые столбцы – 50 дней воздействия, серые – 100 дней

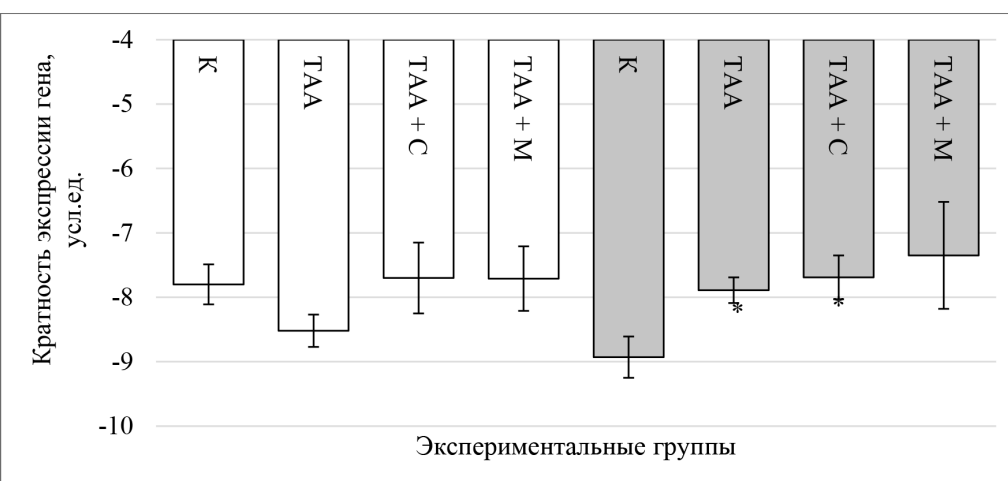


Рис. 2. Изменение кратности экспрессии гена *Htox1* в ткани почек крыс при субхроническом (50 дней) и хроническом (100 дней) воздействии ТАА и на фоне фармакологической коррекции. По оси ординат – относительная кратность экспрессии (нормализована к *Gapdh*), по оси абсцисс – экспериментальные группы. * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой отрицательного контроля (К) соответствующего временного периода; # – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой ТАА соответствующего временного периода. Белые столбцы – 50 дней воздействия, серые – 100 дней

Как видно на рис. 2, экспрессия гена *Htox1* на 50-й день достоверно не отличалась между всеми исследуемыми группами, что указывает на отсутствие выраженной активации антиоксидантного ответа в изученные сроки воздействия. К 100-му дню воздействия наблюдалось статисти-

чески значимое снижение экспрессии *Htox1* в группе ТАА по сравнению с контролем ($-8,93 \pm 0,32$ против $-7,89 \pm 0,20$; $p = 0,036$), что может отражать истощение компенсаторного ответа на фоне хронической нагрузки. При этом в группе ТАА + Саликс также было зафиксировано досто-

верное различие по сравнению с контролем ($-8,93 \pm 0,32$ против $-7,69 \pm 0,34$; $p = 0,042$), тогда как в группе ТАА + МГ-10 изменения не достигали статистической значимости ($p > 0,05$).

Суммарно данные указывают на то, что молекулярный отклик почек при хроническом воздействии ТАА развивается медленно, с ограниченной включенностью транскрипционных антиоксидантных механизмов. Согласно результатам проведенного исследования, адеметионин оказывал более выраженное действие на экспрессию *Nqo1* на раннем этапе, но не предотвращал снижение *Hmox1* в поздний срок, тогда как комплекс 5-гидрокси-6-метилурацила с ацетилцистеином не модулировал *Nqo1*, но демонстрировал тенденцию к сохранению кратности экспрессии на уровне отрицательного контроля гена *Hmox1* к 100-му дню. Это может свидетельствовать о различиях в точках приложения действия препаратов: адеметионин преимущественно активизирует эпигенетические и метаболические пути антиоксидантного ответа, а комплекс 5-гидрокси-6-метилурацила с ацетилцистеином действует скорее через стабилизацию митохондрий и подавление вторичного воспалительного каскада, не вовлекая напрямую путь Nrf2.

Полученные данные важны для развития направлений, связанных с фармакологической коррекцией нефротоксических эффектов, возникающих при хроническом токсическом воздействии. Показанная ограниченность включения антиоксидантного ответа в ткани почек при экспозиции тиацетамида может указывать на латентное течение патологического процесса. Перспективным направлением также является расширение панели молекулярных маркеров с включением генов воспалительного ответа, апоптоза и митохондриального гомеостаза, а также комплексное сопоставление молекулярных данных с биохимическими и морфологическими характеристиками. Это позволит сформировать более полное представление о патогенезе ТАА-индуцированной нефротоксичности и создать обоснованную платформу для оценки эффективности коррекционных воздействий.

Заключение

В условиях хронического воздействия тиацетамида в почечной ткани крыс не зафиксировано выраженной активации генов антиоксидантного ответа. Установлено, что адеметионин способен усиливать экспрессию *Nqo1* на ранних сроках воздействия, тогда как 5-гидрокси-6-метилурацил с ацетилцистеином статистически значимых изменений не показал, что свидетельствует о различии в механизмах их действия.

Список литературы

1. Elbaset M.A., Mohamed B.M.S.A., Gad S.A., Afifi S.M., Abdelrahman T.E.S.S., Fayed H.M. Erythropoietin mitigated thioacetamide-induced renal injury via JAK2/STAT5 and AMPK pathway // Scientific Reports. 2023. Vol. 13. P. 14929. DOI: 10.1038/s41598-023-42210-1.
2. Zhang H., Xu J. Unveiling thioacetamide-induced toxicity: Multi-organ damage and omitted bone toxicity // Hum. Exp. Toxicol. 2024. Vol. 43. DOI: 10.1177/09603271241241807.
3. Sepehrinezhad A., Shahbazi A., Sahab Negah S., Joghataei M.T., Larsen F.S. Drug-induced-acute liver failure: A critical appraisal of the thioacetamide model for the study of hepatic encephalopathy // Toxicol. Rep. 2021. № 8. P. 962–970. DOI: 10.1016/j.toxrep.2021.04.011.
4. Chilakapati J., Korrapati M.C., Hill R.A., Warbritton A., Latendresse J.R., Mehendale H.M. Toxicokinetics and toxicity of thioacetamide sulfoxide: a metabolite of thioacetamide // Toxicology. 2007. Vol. 230, Is. 2–3. P. 105–116. DOI: 10.1016/j.tox.2006.11.050.
5. Li X., Chen W., Feng J., Zhao B. Incidence of death from kidney diseases among cancer patients: A US population-based analysis // Int. Urol. Nephrol. 2021. № 53. P. 2627–2633. DOI: 10.1007/s11255-021-02801-1.
6. Nasri H. Chronic kidney disease and aging: a global health alert // Iran. J. Public Health. 2014. № 43. P. 126–127.
7. Репина Э.Ф., Гимадиева А.Р., Каримов Д.О., Кудряков Э.Р., Хуснутдинова Н.Ю., Тимашева Г.В., Байгильдин С.С. Комплексное соединение 5-гидрокси-6-метилурацила с N-ацетилцистеином, проявляющее антигипоксическую активность, и способ его получения // Патент РФ RU2751632C1 от 09.12.2020.
8. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method // Methods. 2001. Vol. 25, Is. 4. P. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
9. Ryter S.W. Heme Oxygenase-1: an anti-inflammatory effector in cardiovascular, lung, and related metabolic disorders // Antioxidants (Basel). 2022. Vol. 11, Is. 3. P. 555. DOI: 10.3390/antiox11030555.
10. Rashid M.H., Babu D., Siraki A.G. Interactions of the antioxidant enzymes NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and NRH: Quinone oxidoreductase 2 (NQO2) with pharmacological agents, endogenous biochemicals and environmental contaminants // Chem. Biol. Interact. 2021. No. 345. P. 109574. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109574.
11. Новгородская Я.И., Островская О.Б., Кравчук Р.И., Дорошенко Е.М., Гуляй И.Э., Алещик А.Ю., Шалесная С.Я., Курбат М.Н. Способ моделирования экспериментального тиацетамидного поражения печени у крыс // Гепатология и гастроэнтерология. 2020. Т. 4. № 1. С. 90–95. DOI: 10.25298/2616-5546-2020-4-1-90-95.
12. Новгородская Я.И. Метаболические изменения в почках крыс после длительного введения тиацетамида // Актуальные проблемы биохимии: сборник материалов научно-практической конференции с международным участием. Гродно, 2021. С. 194–197.
13. Tchanchou F., Graves M., Falcone D., Shea T.B. S-adenosylmethionine mediates glutathione efficacy by increasing glutathione S-transferase activity: implications for S-adenosyl methionine as a neuroprotective dietary supplement // J. Alzheimers Dis. 2008. Vol. 14, Is. 3. P. 323–328. DOI: 10.3233/jad-2008-14306.
14. Райхельсон К.Л., Буеверов А.О., Кондрашина Э.А., Маевская М.В., Хлынов И.Б., Широкова Е.Н., Ивашкин В.Т. Внутривенный холестаз при хронических заболеваниях печени и роль адеметионина в его лечении (обзор литературы и резолюция Совета экспертов) // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2024. Т. 34. № 4. С. 20–33. DOI: 10.22416/1382-4376-2024-1167-3098-1.
15. Bege M., Borbás A. The Medicinal Chemistry of Artificial Nucleic Acids and Therapeutic Oligonucleotides // Pharmaceuticals (Basel). 2022. Vol. 15, Is. 8. P. 909. DOI: 10.3390/ph15080909.