

УДК 577.218

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА, ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И АПОПТОЗА (*Chek1*, *Hmox1*, *Casp7*) В ПЕЧЕНИ КРЫС В ОТВЕТ НА ТЕТРАХЛОРМЕТАН

© 2019 г. Г. Ф. Мухаммадиева<sup>а</sup>, \*, Д. О. Каримов<sup>а</sup>, Т. Г. Кутлина<sup>а</sup>, Я. В. Валова<sup>а</sup>, Н. Ю. Хуснудинова<sup>а</sup>, Э. Ф. Репина<sup>а</sup>, А. Б. Бакиров<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека, Уфа, 450106 Россия

\*e-mail: [ufniimt@mail.ru](mailto:ufniimt@mail.ru)

Поступила в редакцию 13.04.2018 г.

После доработки 03.08.2018 г.

Принята к публикации 03.08.2018 г.

Тетрахлорметан относится к одному из наиболее хорошо изученных гепатотропных ядов. Отравление экспериментальных животных тетрахлометаном схоже с острыми поражениями печени различной этиологии у человека. Исследована экспрессия генов контроля клеточного цикла, апоптоза и окислительного стресса на модели индуцированного тетрахлометаном токсического гепатита. В работе использованы белые беспородные крысы-самцы, которым однократно вводили 50%-ный масляный раствор тетрахлометана в дозе 0.125–4.000 г/кг (экспериментальная группа) или оливковое масло (контрольная группа). Через 24 и 72 ч после введения тетрахлометана животных декапировали и, используя ПЦР в режиме реального времени, анализировали в печени экспрессию генов гемоксигеназы-1 (*Hmox1*), киназы-1 контрольной точки клеточного цикла (*Chek1*) и каспазы-7 (*Casp7*). Показано, что в печени животных из экспериментальной группы повышена экспрессия генов *Hmox1* и *Chek1*, возможно, принимающих участие в патологических процессах, происходящих в печени при воздействии окислительного стресса. Можно предположить, что при формировании токсического поражения печени под действием тетрахлометана наибольший вклад в гибель клеток вносит некроз.

**Ключевые слова:** *Hmox1*, *Chek1*, *Casp7*, экспрессия генов, токсическое поражение печени, тетрахлометан, окислительный стресс

DOI: 10.1134/S0026898419010105

### ВВЕДЕНИЕ

Токсическое поражение печени может привести к необратимым нарушениям функционирования организма человека [1, 2]. При попадании в печень токсических агентов происходят морфологические изменения ткани органа и связанные с ними обменные нарушения [3]. Один из главных механизмов повреждения клеток печени — образование свободных радикалов и активных метаболитов кислорода, которые стимулируют перекисное окисление липидов, тем самым повреждая мембраны клеток печени и эндоплазматической сети, что приводит к гибели гепатоцитов [4, 5]. Токсическое поражение печени часто сопровождается серьезным повреждением ДНК гепатоцитов, что приводит к активации путей репарации ДНК или к гибели клетки путем некроза или апоптоза.

Тетрахлорметан (CCl<sub>4</sub>) применяют для моделирования заболеваний печени. При воздействии CCl<sub>4</sub> происходит развитие дистрофических и некротических изменений в ткани печени, а затем установление гистологической картины фиброза или цирроза [6].

Ведущую роль в поддержании функционального и структурного гомеостаза печени играет гемоксигеназная сигнальная система, способная активировать как защитно-адаптационные механизмы, так и деструктивно-патологические [7]. Изофермент гемоксигеназа-1 относится к белкам теплового шока, его экспрессия может быть индуцирована с помощью многих агентов, в том числе CCl<sub>4</sub>. Гемоксигеназа-1 принимает участие в адаптации клеток и тканей к действию окислительного стресса [8]. При гиперактивации гемоксигеназы-1 повышается резистентность клеток к

Сокращения: CCl<sub>4</sub> — тетрахлометан; CO — монооксид углерода; ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) и ATR (ATM Related) — серин/треониновые протеинкиназы.

апоптотическим и некротическим изменениям, снижается воспалительная реакция, угнетается фиброгенная активность звездчатых клеток печени [9, 10]. Основные функциональные характеристики гемоксигеназы-1 обусловлены свойствами продуктов ее реакции: монооксида углерода (СО) и билирубина.

Протеолитическая система, включающая семейство каспаз, считается ключевым участником апоптоза. Эти белки принадлежат к классу цистеиновых протеаз [11]. Выделяют 14 видов каспаз, работающих по каскадному механизму. По выполняемой каспазами функции их можно разделить на 3 группы: активаторы цитокинов; каспазы-индукторы активации эффекторных каспаз; эффекторные каспазы-исполнители апоптотической программы [12, 13]. При активации эффекторных каспаз происходит деградация белков клетки, ответственных за различные жизненные функции, что в итоге приводит к образованию апоптотических телец. К эффекторным каспазам относится каспаза-7, которая принимает участие в финальной стадии процесса апоптоза [14].

Важную роль в поддержании геномной стабильности в клетке играет молекулярная система, вызывающая остановку клеточного цикла, экспрессия белков репарации или апоптотические сигнальные пути при невозможности удаления повреждения. Активируясь в ответ на разнообразные нарушения структуры ДНК, специфические протеинкиназы АТМ (Ataxia-Telangiectasia Mutated) и АТР (АТМ Related) фосфорилируют ряд своих мишеней, в том числе эффекторные киназы СНЕК1 и СНЕК2 (киназы 1 и 2 контрольных точек клеточного цикла); причем киназа АТМ специфично фосфорилирует СНЕК2, а АТР — СНЕК1 [15–17]. Киназы СНЕК1 и СНЕК2 — это серин/треониновые киназы, не гомологичные по структуре, но сходные по функциям и субстратам фосфорилирования. Они служат связующим звеном между киназами АТМ/АТР и белковыми комплексами, непосредственно принимающими участие в процессах репарации ДНК. Эти киназы координируют процессы, происходящие по мере продвижения по клеточному циклу, играя роль своеобразного “переключателя” между репарацией и апоптозом. Активирующее фосфорилирование СНЕК1 и СНЕК2 приводит в итоге к остановке синтетических процессов и восстановлению стабильности генома [18].

Нами исследована экспрессия генов, которые кодируют ферменты, принимающие участие в контроле окислительного стресса, клеточного цикла и апоптоза, а именно гемоксигеназу-1 (*Hmox1*), киназу-1 контрольных точек (*Chek1*) и каспазу-7 (*Casp7*). Исследования проведены в условиях токсического поражения печени у крыс.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Животные.** Работа проведена на 84 белых беспородных крысах-самцах массой 170–190 г. Животным контрольной группы ( $n = 12$ ) подкожно вводили оливковое масло, а экспериментальной группы ( $n = 72$ ) — 50%-ный масляный раствор  $CCl_4$  (однократно в дозе 0.125–4.000 г/кг массы тела животного). На каждую дозу  $CCl_4$  брали по 6 животных. Через 24 и 72 ч после начала опыта исследовали печень декапитированных крыс. Животных обеих групп одинаково кормили и содержали в одних и тех же условиях. При уходе за животными и проведении экспериментов руководствовались базисными нормативными документами: “Рекомендациями комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Министерстве здравоохранения Российской Федерации”, рекомендациями ВОЗ, рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей [19].

**Пробоподготовка и ПЦР-анализ.** Экспрессию генов анализировали с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Для проведения исследований кусочки печени замораживали жидким азотом. Из полученных образцов выделяли тотальную РНК с помощью реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. Синтез кДНК проводили с матрицы выделенной тотальной РНК с использованием набора реактивов MMLV RT kit с праймеров олиго(dT)<sub>15</sub> (“Евроген”, Россия). С полученными кДНК ставили ПЦР на амплификаторе Rotor-Gene Q (“Qiagen”, Германия) в присутствии SYBR Green. Олигонуклеотидные праймеры для ПЦР подбирали с помощью программы PrimerQuest (“Integrated DNA Technologies, Inc.”, США). Выбранные праймеры синтезированы фирмой “Евроген”.

### *Hmox1:*

5'-CTCACAGACAGAGTTCCTTCGC-3' (прямой),

5'-GCTGATCTGGGATTTCCCTCGG-3' (обратный).

### *Chek1:*

5'-ATACTGGTTGACTTCCGGCT-3' (прямой),

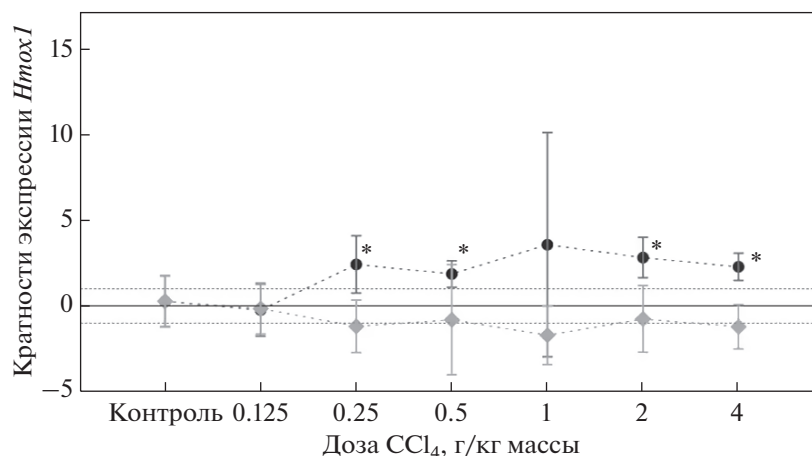
5'-CGCTGAGCTTCCCTTTAATCTT-3' (обратный).

### *Casp7:*

5'-CCCGCTACAAGATCCCGGTG-3' (прямой),

5'-GCACAAACCAGGAGCCCTTTC-3' (обратный).

Каждую реакцию ПЦР, содержащую 2 мкл кДНК, проводили в объеме 25 мкл в следующих условиях: предварительный прогрев при 95°C в течение 3 мин, после чего следовало 45 основных



**Рис. 1.** Экспрессия гена *Hmox1* в печени крыс через 24 (●) и 72 (◆) ч после обработки  $\text{CCl}_4$ . Символом (\*) обозначены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля. Маркерами (┐) и (┘) отмечен 95%-ный доверительный интервал. Пунктирной линией отмечены уровни кратности экспрессии, равные 1 и -1.

циклов: 15 с при  $95^\circ\text{C}$ , 25 с при  $59^\circ\text{C}$  и 15 с при  $72^\circ\text{C}$ . В качестве гена сравнения использовали ген домашнего хозяйства *Gapdh*.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), а также *H*-критерия Краскела–Уоллиса для попарного сравнения групп. Результаты считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Ген *Hmox1*.** В результате проведенных исследований показано, что через 24 ч после введения крысам  $\text{CCl}_4$  в дозе 0.125 г/кг наблюдается незначительное снижение экспрессии гена *Hmox1* по сравнению с контрольной группой животных ( $H = 0.31$ ,  $p = 0.76$ ) (рис. 1). При более высоких дозах  $\text{CCl}_4$ , 0.25 и 0.5 г/кг, уровень экспрессии *Hmox1* увеличивался соответственно в 2.4 ( $H = 2.63$ ,  $p = 0.009$ ) и в 1.9 раз ( $H = 2.46$ ,  $p = 0.014$ ). Транскрипционная активность этого гена достигала максимального значения (в 3.6 раз выше контрольного) при дозе  $\text{CCl}_4$  1 г/кг ( $H = 1.65$ ,  $p = 0.163$ ), но различия в этом случае не были статистически значимыми. При повышении дозы до 2 г/кг и 4 г/кг уровень экспрессии *Hmox1* немного снижался, но оставался выше контрольных значений более чем в 2 раза ( $H = 3.48$ ,  $p = 0.001$  и  $H = 2.95$ ,  $p = 0.003$  соответственно).

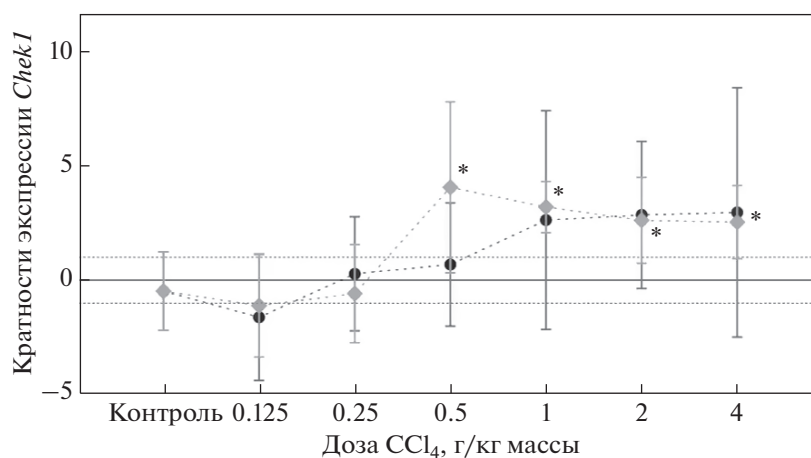
Иной характер носила динамика экспрессии гена *Hmox1* через 72 ч после введения  $\text{CCl}_4$  (рис. 1). При введении минимальной дозы  $\text{CCl}_4$  экспрессия *Hmox1* практически не отличалась от контроля ( $H = 0.4$ ,  $p = 0.65$ ), с увеличением дозы от 0.25 г/кг до 4 г/кг наблюдалось незначительное снижение

уровня мРНК гена *Hmox1* ( $p > 0.05$ ); при этом отличие от контрольной группы не превосходило 1.7 раза. Максимальное снижение экспрессии *Hmox1* отмечено при дозе 1 г/кг ( $H = 0.83$ ,  $p = 0.56$ ).

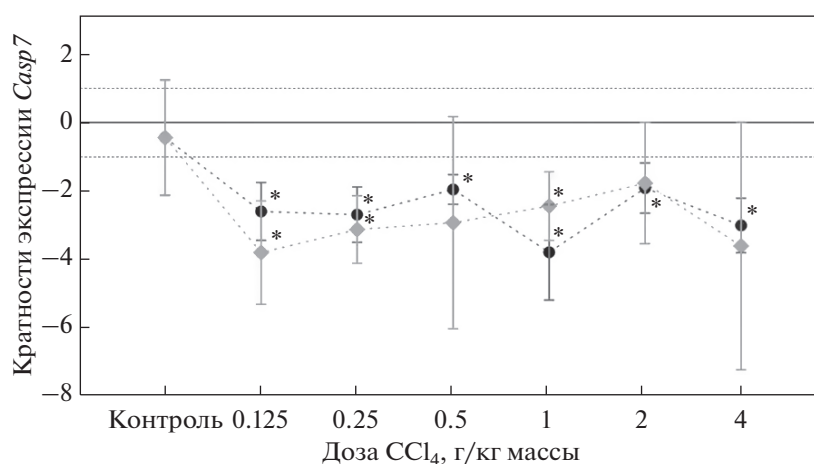
**Ген *Chek1*.** Нами проанализирована экспрессия гена *Chek1* через 24 и 72 ч после введения разных доз  $\text{CCl}_4$  (рис. 2). Через 24 ч отмечено снижение уровня экспрессии гена *Chek1* в 1.6 раз при дозе  $\text{CCl}_4$  0.125 г/кг ( $H = 0.82$ ,  $p = 0.415$ ). Дальнейшее увеличение дозы  $\text{CCl}_4$  от 0.25 г/кг до 4 г/кг приводило к нарастанию уровня экспрессии. Максимально высокая транскрипционная активность (в 2.9 раз выше контрольной) зарегистрирована при дозе 4 г/кг ( $H = 1.74$ ,  $p = 0.142$ ). Таким образом, для гена *Chek1* выявлена следующая тенденция: увеличение экспрессии гена *Chek1* при повышении дозы токсиканта, — но без достижения уровня статистической значимости.

Через 72 ч после введения  $\text{CCl}_4$  в дозе 0.125 г/кг уровень транскриптов гена *Chek1* снизился немного ниже контрольного — в 1.1 раз ( $H = 0.64$ ,  $p = 0.52$ ). При воздействии  $\text{CCl}_4$  в дозе 0.25 г/кг экспрессия гена *Chek1* практически не отличалась от контрольного уровня ( $H = 0.19$ ,  $p = 0.85$ ). В группе крыс, обработанных  $\text{CCl}_4$  в дозе 0.5 г/кг, экспрессия гена *Chek1* повышалась в 4.1 раз, достигая максимального значения ( $H = 3.00$ ,  $p = 0.003$ ); при увеличении дозы от 1 г/кг до 4 г/кг уровень экспрессии несколько снижался, но по-прежнему превышал исходный в 2–3 раза ( $p < 0.05$ ).

**Ген *Casp7*.** Экспрессию гена *Casp7* анализировали также через 24 и 72 ч после введения разных доз  $\text{CCl}_4$ . В целом, уровень экспрессии этого гена оставался ниже исходных значений вне зависимости от дозы и времени воздействия токсиканта. Однако есть некоторые различия в динамике экс-



**Рис. 2.** Экспрессии гена *Chek1* в печени крыс через 24 (●) и 72 (◆) ч после обработки  $\text{CCl}_4$ . Символом (\*) обозначены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля. Маркерами (┌) и (└) отмечен 95%-ный доверительный интервал. Пунктирной линией отмечены уровни кратности экспрессии, равные 1 и -1.



**Рис. 3.** Экспрессии гена *Casp7* в печени крыс через 24 (●) и 72 (◆) ч после обработки  $\text{CCl}_4$ . Символом (\*) обозначены значения, статистически значимо отличающиеся от контроля. Маркерами (┌) и (└) отмечен 95%-ный доверительный интервал. Пунктирной линией отмечены уровни кратности экспрессии, равные 1 и -1.

прессии гена *Casp7* через 24 и 72 ч после введения  $\text{CCl}_4$  (рис. 3).

Тетрахлорметан при введении крысам в дозе 0.125 г/кг через 24 ч вызывал почти трехкратное снижение уровня экспрессии гена *Casp7* относительно контрольного ( $H = 3.04$ ,  $p = 0.002$ ). Экспрессия сохранялась почти на том же уровне и при воздействии  $\text{CCl}_4$  в дозе 0.25 г/кг ( $H = 3.19$ ,  $p = 0.001$ ). Наиболее выраженное снижение экспрессии гена *Casp7* происходило при дозе  $\text{CCl}_4$  1 г/кг и 4 г/кг – в 3.8 ( $H = 4.54$ ,  $p = 0.001$ ) и 3.0 ( $H = 3.94$ ,  $p = 0.001$ ) раза соответственно. При дозе 0.5 г/кг и 2 г/кг наблюдалось небольшое повышение уровня транскрипта, но при этом показатели сохранялись ниже исходного уровня ( $H = 2.46$ ,  $p = 0.013$  и  $H = 2.20$ ,  $p = 0.028$  соответственно).

Экспрессия гена *Casp7* через 72 ч после воздействия  $\text{CCl}_4$  в дозе 0.125 г/кг была более чем в 3 раза снижена в сравнении с контрольной группой ( $H = 3.87$ ,  $p = 0.001$ ). Выявлены определенные тенденции в изменении экспрессии этого гена при воздействии разных доз  $\text{CCl}_4$ . При повышении дозы  $\text{CCl}_4$  от 0.25 г/кг ( $H = 3.32$ ,  $p = 0.001$ ) до 2 г/кг ( $H = 1.86$ ,  $p = 0.063$ ) уровень транскрипта гена *Casp7* немного повышался, а воздействие  $\text{CCl}_4$  в дозе 4 г/кг сопровождалось снижением уровня экспрессии в 3.6 раза, хотя различия не были статистически значимыми ( $H = 1.62$ ,  $p = 0.10$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ген *Hmox1* кодирует гемооксигеназу-1, которая принимает участие в окислении свободного

гема и превращении его в антиоксидант билирубин. Индукция клетками гемоксигеназы-1 в ответ на внешние факторы способствует снижению интенсивности окислительных процессов, ингибирует синтез фактора некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) и снижает активность каспазы-3, тем самым препятствует развитию деструктивных процессов в печени [20, 21]. Установлено, что подавление экспрессии гемоксигеназы-1 у животных приводит к некротическим воспалительным процессам в печени [22].

Нами показано, что через 24 ч после введения крысам  $CCl_4$  в печени животных экспрессия гена *Hmox1* усиливалась. Повышение экспрессии *Hmox1* в ответ на окислительный стресс, возможно, представляет собой один из механизмов сохранения структурно-функциональной целостности органа. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей, согласно которым в небольших дозах  $CCl_4$  усиливает экспрессию гена *Hmox1* [23]. Известно антиапоптотическое действие гемоксигеназы-1, обусловленное образованием продуктов реакции, главным образом СО. Антиапоптотический эффект СО может быть связан с угнетением активности каспаз [24].

Однако через 72 ч после введения крысам  $CCl_4$  происходило снижение экспрессии *Hmox1*, что может быть обусловлено преобладанием некротических процессов в тканях печени, которые сопровождаются изменениями в паттернах экспрессии генов.

Ген *Chek1* кодирует синтез киназы 1 контрольной точки клеточного цикла, или чекпойнт-киназы-1. Белковый продукт гена *Chek1* – “ключевой игрок” в механизме остановки клеточного цикла в S и G2/M фазах. Основной мишенью этой киназы служат белки семейства CDC25, которые удаляют гиперфосфорилирование регулируемых ими циклинзависимых киназ. В результате замедляется репликация ДНК и предотвращается вход клеток в митоз [25, 26].

При изучении экспрессии *Chek1* в образцах ткани печени крыс, полученной через 24 ч после воздействия  $CCl_4$ , заметна тенденция к повышению уровня транскриптов этого гена в зависимости от дозы токсического вещества. Возможно, это связано с тем, что в ответ на нарушения структуры ДНК происходит активация специфических киназ (ATM, ATR и их мишеней – CHEK1 и CHEK2), играющих ключевую роль в интеграции сигналов от поврежденной ДНК и их дальнейшей передаче разнообразным эффекторам [27].

В общих чертах в экспрессии гена *Chek1* через 72 ч после воздействия  $CCl_4$  просматривается та же тенденция к повышению при увеличении дозы токсиканта. Максимальный уровень наблюдался при дозе 0.5 г/кг, при увеличении дозы вплоть до 4 г/кг выраженных изменений не зарегистриро-

вано. По-видимому, активированная протеинкиназа ATR, накапливаясь в местах повреждений, фосфорилирует несколько эффекторов, включая CHEK1 [28], которые в свою очередь фосфорилируют и инактивируют белки семейства CDC25, приводя к опосредованному ингибированию комплекса CDK–циклин и, тем самым, вызывая задержку или остановку клеточного цикла [29, 30].

Ген *Casp7* кодирует каспазу-7, которая относится к эффекторным каспазам. Каспаза-7 играет роль ключевого регулятора регенерации ткани. Активную форму каспазы-7 можно обнаружить в митохондриальной и микросомальной фракции гепатоцитов [31, 32].

При использованных дозах  $CCl_4$  в обоих временных промежутках в исследуемых группах животных наблюдалось снижение уровня транскриптов гена *Casp7* в печени. Это значит, что в условиях, неблагоприятных для развития каспазного каскада, запускаемого каспазой-7, будет снижена апоптотическая активность клеток. Возможно, в случае инактивации каспазы-7 происходит запуск некроптоза. Ранее показано [33], что гепатотоксичность, которую оценивали с помощью метода ДНК-комет, обусловлена повреждением генома гепатоцитов. В группе животных, которым вводили  $CCl_4$  в дозе 0.4 мл/кг/сутки, в печени повышалась доля некрозо-апоптотических клеток (поврежденные клетки с признаками некроза и апоптоза) по сравнению с контролем.

Таким образом, у крыс, подвергнутых однократному токсическому воздействию  $CCl_4$  в разных дозах и при разном времени воздействия, обнаружено повышение транскрипционной активности как гена, участвующего в регуляции окислительного стресса (*Hmox1*), так и гена, контролирующего клеточный цикл (*Chek1*), а также снижение экспрессии гена, вовлеченного в регуляцию апоптоза (*Casp7*). На основании полученных результатов можно предположить, что при формировании токсического поражения печени под действием  $CCl_4$  наибольший вклад в гибель клеток вносит некроз. Полученные данные расширяют наши представления о молекулярных механизмах повреждения печени при воздействии  $CCl_4$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Валеева Э.Т. (2011) Профессиональные токсические поражения печени у работников производства жидкого топлива. *Здравоохранение Российской Федерации*. 4, 50–51.
2. Косарев В.В., Бабанов С.А. (2009) Токсические (токсико-аллергические) гепатиты. *Гастроэнтерология. Приложение к журналу Consilium Medicum*. 2, 29–30.
3. Владимиров Ю.А. (2000) Свободные радикалы в биологических системах. *Соросовский образовательный журнал*. 12, 13–19.

4. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. (1986) *Общие механизмы токсического действия*. Ленинград: Медицина.
5. Кравченко Л.В., Трусов Н.В., Ускова М.А., Аksenov И.В., Авреньева Л.И., Гусева Г.В., Васильева М.А., Селифанов А.В., Тутельян В.А. (2009) Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса. *Токсикологический вестник*. **1**, 12–18.
6. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit. Ref. Toxicol.* **33**, 105–136.
7. Li Volti G., Sacerdoti D., Di Giacomo C., Barcelloна M.L., Scacco A., Murabito P., Biondi A., Basile F., Gazzolo D., Abella R., Frigiola A., Galvano F. (2008) Natural heme oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function. *World J. Gastroenterol.* **14**, 6122–6132.
8. Wen T., Guan L., Zhang Y.L., Zhao J.Y. (2006) Dynamic changes of heme oxygenase-1 and carbon monoxide production in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Toxicology*. **228**, 51–57.
9. Abraham N.G., Kappas A. (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.* **60**, 79–127.
10. Soares M.P., Bach F.H. (2009) Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* **15**, 50–58.
11. Chinnaiyan A.M., Dixit V.M. (1996) The cell-death machine. *Curr. Biol.* **6**, 555–562.
12. Владимирская Е.Б. (2002) Механизмы апоптотической смерти клеток. *Гематология и трансфузиология*. **47**, 35–40.
13. Рыжов С.В., Новиков В.В. (2002) Молекулярные механизмы апоптотических процессов. *Российский биотерапевтический журнал*. **1**, 27–33.
14. Lamkanfi M., Kanneganti T.D. (2010) Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 21–24.
15. Brown E.J., Baltimore D. (2003) Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* **17**, 615–628.
16. Liu Q., Guntuku S., Cui X.S., Matsuoka S., Cortez D., Tamai K., Luo G., Carattini-Rivera S., DeMayo F., Bradley A., Donehower L.A., and Elledge S.J. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* **14**, 1448–1459.
17. Zhou B.B., Elledge S.J. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. **408**, 433–439.
18. Hiom K. (2005) DNA repair: how to PIKK a partner. *Curr. Biol.* **15**, 473–475.
19. Белоусова Ю.Б. (2005) *Этическая экспертиза биомедицинских исследований: практические рекомендации*. Москва: Оки.
20. Jais A., Einwallner E., Sharif O., Gossens K., Lu T.T., Soyak S.M., Medgyesi D., Neureiter D., Paier-Pourani J., Dalggaard K., Duvigneau J.C., Lindroos-Christensen J., Zapf T.C., Amann S., Saluzzo S., Jantscher F., Stiedl P., Todoric J., Martins R., Oberkofler H., Müller S., Hauser-Kronberger C., Kenner L., Casanova E., Sutterlüty-Fall H., Bilban M., Miller K., Kozlov A.V., Krempler F., Knapp S., Lumeng C.N., Patsch W., Wagner O., Pospisilik J.A., Esterbauer H. (2014) Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. *Cell*. **158**, 25–40.
21. Jou J., Choi S., Diehl A. (2008) Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* **28**, 370–379.
22. Yao P., Li K., Song F., Zhou S., Sun X., Zhang X., Nussler A.K., Liu L. (2007) Heme oxygenase-1 upregulated by *Ginkgo biloba* extract: potential protection against ethanol-induced oxidative liver damage. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1333–1342.
23. Randle L.E., Goldring C.E., Benson C.A., Metcalfe P.N., Kitteringham N.R., Park B.K., Williams D.P. (2008) Investigation of the effect of a panel of model hepatotoxins on the Nrf2-Keap1 defence response pathway in CD-1 mice. *Toxicology*. **243**, 249–260.
24. Conde de la Rosa L., Vrenken T.E., Hannivoort R.A., Buist-Homan M., Havinga R., Slebos D.J., Kauffman H.F., Faber K.N., Jansen P.L., Moshage H. (2008) Carbon monoxide blocks oxidative stress-induced hepatocyte apoptosis via inhibition of the p54 JNK isoform. *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1323–1333.
25. Beck H., Nähse V., Larsen M.S., Groth P., Clancy T., Lees M., Jørgensen M., Helleday T., Syljuåsen R.G., Sørensen C.S. (2010) Regulators of cyclin dependent kinases are crucial for maintaining genome integrity in S phase. *J. Cell Biol.* **188**, 629–638.
26. Cerqueira A., Santamaría D., Martínez-Pastor B., Cuadrado M., Fernández-Capetillo O., Barbacid M. (2009) Overall Cdk activity modulates the DNA damage response in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **187**, 773–780.
27. Заридзе Д.Г. (2004) *Канцерогенез*. Москва: Медицина.
28. Brown E.J., Baltimore D. (2003) Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* **17**, 615–628.
29. Morgan D. (2007) *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press.
30. Reinhardt H.C., Yaffe M.B. (2009) Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 245–255.
31. Chandler J.M., Cohen G.M., MacFarlane M. (1998) Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **273**, 10815–10818.
32. Li F., Huang Q., Chen J., Peng, Y., Roop D.R., Bedford J.S., Li C.Y. (2010) Apoptotic cells activate the “phoenix rising” pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci. Signal.* **3**, ra13.
33. Кропотов А.В., Челомин В.П., Слободскова В.В., Солодова Е.Е., Михайлов А.О. (2013) Оценка генотоксичности тетрахлорметана и защитного действия силибинина и хаурантина с помощью метода ДНК-комет в печени крыс. *Тихоокеанский медицинский журнал*. **2**, 63–66.

## EXPRESSION OF CELL CYCLE, OXIDATIVE STRESS AND APOPTOSIS RELATED GENES *Chek1*, *Hmox1*, *Casp7* IN THE LIVER OF RATS EXPOSED TO CARBON TETRACHLORIDE

G. F. Mukhammadiyeva<sup>1</sup>\*, D. O. Karimov<sup>1</sup>, T. G. Kutlina<sup>1</sup>, Ya. V. Valova<sup>1</sup>,  
N. Yu. Khusnutdinova<sup>1</sup>, E. F. Repina<sup>1</sup>, A. B. Bakirov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, 450106 Russia

\*e-mail: ufnimt@mail.ru

Carbon tetrachloride is a well-studied hepatotropic poison. Animal models of exposure to carbon tetrachloride resemble acute liver damage in humans. Here we present the study of the expression of cell cycle control, apoptosis and oxidative stress related genes in a model of carbon tetrachloride-induced toxic hepatitis in rats. White mongrel male rats were injected with 50% oil solution of carbon tetrachloride at a dose of 0.125–4.000 g/kg (experimental group) or olive oil (control group). At 24 and at 72 h after administration of carbon tetrachloride, the animals were decapitated, and the qRT-PCR expression levels of the genes encoding hemoxygenase-1 (*Hmox1*), cell cycle checkpoint kinase-1 (*Chek1*) and caspase-7 (*Casp7*) were analyzed in collected livers. Increases in the expression levels of *Hmox1* and *Chek1* have been detected after exposure. Those genes may either play a role in promoting pathological oxidative stress in the liver or be a part of a stress response. We have also concluded that the major pathway of the liver damage in carbon tetrachloride exposed animals is necrosis rather than apoptosis.

**Keywords:** *Hmox1*, *Chek1*, *Casp7*, gene expression, toxic liver damage, carbon tetrachloride, oxidative stress