

DOI: 10.26693/jmbs02.05.179

УДК 616.36+616-006.6+546.72+616-092.9

Кіндрат І. П., Ерстенюк Г. М.

ВПЛИВ ГЕПАТОТОКСИКАНТУ ТА ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНУ 2-АЦЕТИЛАМІНОФЛУОРЕНУ НА ОБМІН ЗАЛІЗА У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ

Івано-Франківський Національний медичний університет

irakindrat0603@gmail.com

Дані останніх років показують, що порушення обміну заліза відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні хронічних захворювань печінки, і є невід'ємною складовою канцерогенезу. Гепатоцелюлярна карцинома (ГЦК) - одне з найбільш поширених швидко прогресуючих онкологічних захворювань печінки. Важливу роль у розвитку ГЦК відводиться хронічним захворюванням печінки, пов'язаних з гемохроматозом, фіброзом, цирозом та алкоголізмом. Наявні дані показують, що змінений метаболізм заліза відіграє важливу роль у розвитку та прогресуванні гепатоцелюлярної карциноми. Проте, на сьогодні відсутня переконлива інформація щодо механізмів даного порушення регуляції за дії гепатотоксинів та гепатоканцерогенів.

З огляду на це, ми дослідили вплив гепатотоксиканту та гепатоканцерогену - 2-ацетиламінофлуорену (2-ААФ) на метаболізм заліза в печінці щурів лінії Спрег-Доулі. В нашому дослідженні ми показали, що 2-ААФ викликає зміни в рівні білку та експресії генів, які кодують білки обміну заліза, зокрема в регуляції експресії трансферинового рецептора 1 (*Tfrr1*), легких ланцюгів феритину (*Ft*) та ферропортину (*Fp*). Дані зміни сприяли накопиченню заліза у клітинах печінки передракових щурів, які отримували 2-ААФ протягом 24 тижнів.

Отже, дані результати досліджень вказують на порушення регуляції обміну заліза в печінці щурів під час канцерогенезу печінки.

Ключові слова: обмін заліза, карцинома, печінка.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом НДР «Розробка методів діагностики, лікування та профілактики стоматологічних захворювань у населення, що проживає в екологічно несприятливих умовах», № держ. реєстрації 011U003681, шифр 2301050

Вступ. Печінці належить важлива роль в регуляції метаболічних процесів, у знешкодженні та детоксикації багатьох ендогенних та екзогенних речовин. Крім того, печінка є центральним регуля-

тором гомеостазу заліза - незамінного елемента для всіх живих організмів [1].

Хронічні форми ураження печінки, такі як: вірусний гепатит С, алкогольна хвороба печінки, гепатоз, пов'язані із розвитком фіброзу печінки, який може прогресувати у цироз. Залізо, за таких умов, є фактором ризику для розвитку та прогресування гепатоцелюлярної карциноми (ГЦК) [2]. ГЦК - один з найбільш поширених швидко прогресуючих видів раку печінки [3]. Значення порушень гомеостазу заліза у виникненні та прогресії онкологічних захворювань, в тому числі і ГЦК, підтверджується даними чисельних експериментальних досліджень [2, 4].

2-ацетиламінофлуорен (2-ААФ) - ароматичний амін, є відомим печінковим токсикантом, який сприяє розвитку оксидативного стресу, запальних процесів та апоптозу в тканині печінки щурів [5]. Вплив 2-ААФ, особливо його здатність індукувати хронічну токсичність печінки, порушувати біохімічний та фізіологічний клітинний гомеостаз, може відігравати важливу роль у розвитку та прогресуванні гепатоканцерогенезу [6] у різних видах та тканинах, включаючи печінку [7]. 2-ААФ проявляє генотоксичний ефект шляхом утворення вільних радикалів, що пошкоджує ДНК та інші макромолекули [6, 8].

Проте, на сьогодні відсутні переконливі дані щодо механізмів впливу гепатотоксинів та гепатоканцерогенів на метаболізм заліза в печінці.

Мета дослідження. З огляду на це, метою нашої роботи було дослідити вплив печінкового токсиканту та карциногену 2-ААФ на обмін заліза у печінці щурів.

Об'єкт і методи дослідження.

Об'єкт дослідження. Дослідження проводилися на щурах-самцях лінії Спрег-Доулі, які були отримані з розплідника Національного центру з токсикологічних досліджень (США). Всі тварини були розміщені в спеціально обладнаному приміщенні з контрольованою температурою і вологістю повітря та примусовою витяжною вентиляцією. Протягом усього експерименту щури отримували стандартний раціон (NIH-31 лабораторна дієта) віварію з вільним доступом до їжі та води. У віці

6-ти тижнів щурів поділяли на 2 групи: контрольну та експериментальну по 5 особин масою 150-200 г. Розчин 2-ААФ (0,02%) вводили перорально щодобово на протязі 24 тижнів шляхом його розведення у питній воді, виходячи з даних результатів експериментальних досліджень [6]. Після 24 тижнів щурів умертвляли шляхом розташування їх у камері з ізофлюорановим газом. Печінку щурів вирізали і негайно заморожували в рідкому азоті і зберігали при -80°C для подальшого аналізу. Всі експериментальні процедури були виконані у відповідності з протоколом досліджень тварин, затвердженим комітетом з догляду та використання тварин Національного центру з токсикологічних досліджень, Джефферсон, США.

Виділення загальної РНК, зворотна транскрипція, та кількісна полімеразна ланцюгова реакція. Виділення загальної РНК із тканин печінки проводили з використанням miRNeasy Mini Kit (Qiagen, США) відповідно до протоколу-інструкції виробника. Зворотня транскрипція проводилась з використанням набору High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, США) відповідно до рекомендацій виробника. Оцінка експресії генів трансферинового рецептора 1 (*Tfrr1*), легких ланцюгів феритину (*Ft*) та ферропортину (*Fp*) проводилась з використанням пресинтезованих TaqMan® Gene Expression Assay (Life Technologies, США) методом відносної експресії. Як референтний ген використовували ген β -актину. Відносну кількість кожного транскрипта мРНК визначали з використанням методу $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ [9].

Вестерн-блот аналіз. Для Вестерн-блот аналізу білок зі зразків виділяли згідно протоколу. Концентрацію загального білка у екстракті тканин виміряли за методом Бредфорда (Bio-Rad, Hercules, CA), використовуючи гібридний мультирежимний мікропланшет Synergy™ H4 (BioTek, Winooski, VT). Екстракти, що містять однакову кількість білка, розділяли за допомогою 8-15% поліакриламідного гелю у присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) і переносили на полівінілдіфлюоридну (PVDF) мембрану. Мембрани інкубували з первинними антитілами проти трансферинового рецепто-

ра 1 (ТФР1, 1: 500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), легких ланцюгів феритину (ФТ; 1: 500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), та ферропортину (ФП, 1: 1000; Alpha Diagnostic International Inc., San Antonio, TX). Для візуалізації були використані вторинні анти-козячі та анти-мишачі антитіла IRDye® 800 (1: 15000; LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). Мембрани були відскановані та проаналізовані за допомогою Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences). Визначення кількості нанесеного білка проводили, враховуючи рівень β -актину (АКТБ; 1: 1000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Аналіз та обрахунок результатів проводили за допомогою Odyssey Image Studio™ Software (LI-COR Biosciences).

Статистичний аналіз. Статистичні розрахунки, а також графічне представлення результатів аналізу проводили за допомогою статистичної програми SigmaPlot 13.0. Результати представлені у вигляді середнього значення \pm S.D, $n=5$. Статистичний аналіз проводили за допомогою *t*-тест і однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA, парні порівняння проводилися за допомогою тесту *Стьюдента-Ньюмена-Кейлса*. Значення $P < 0,05$ вважали достовірним.

Результати досліджень та їх обговорення.

Вплив 2-ААФ на експресію генів, які беруть участь в обміні заліза у печінці щурів

Для того щоб дослідити основні механізми порушення метаболізму заліза під час тривалої дії канцерогену, були визначені рівні мРНК *Tfrr1*, *Ft* та *Fp* в печінці щурів, які протягом 24 тижнів отримували гепатоканцероген 2-ААФ. На рис. 1 показано, що експресія *Tfrr1* та *Ft* в передпухлинних печінках щурів, які отримували 2-ААФ, була збільшена на 62 % та 43% відповідно, порівняно з контролем. На противагу, рівень експресії *Fp* знизився на 30% у щурів досліджуваної групи.

Рівень білка ТФР1, ФТ та ФП в печінці щурів, які отримували 2-ААФ

Отримані результати показали, що введення 2-ААФ призвело до змін експресії генів обміну заліза в печінці щурів. Виходячи з цього, на наступному етапі ми дослідили рівень білків ТФР1, ФТ та

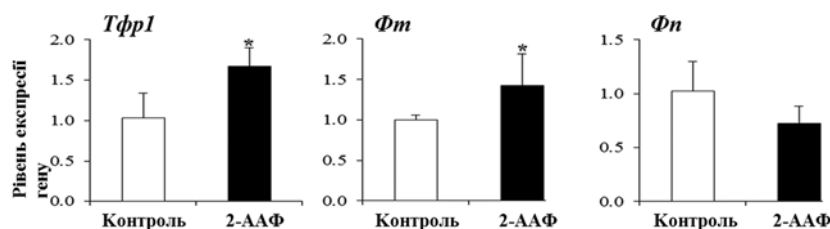


Рис. 1. Рівень експресії генів, кодуєчих білки гомеостазу заліза, *Tfrr1*, *Ft*, і *Fp* у печінці щурів, які отримували 2-ААФ

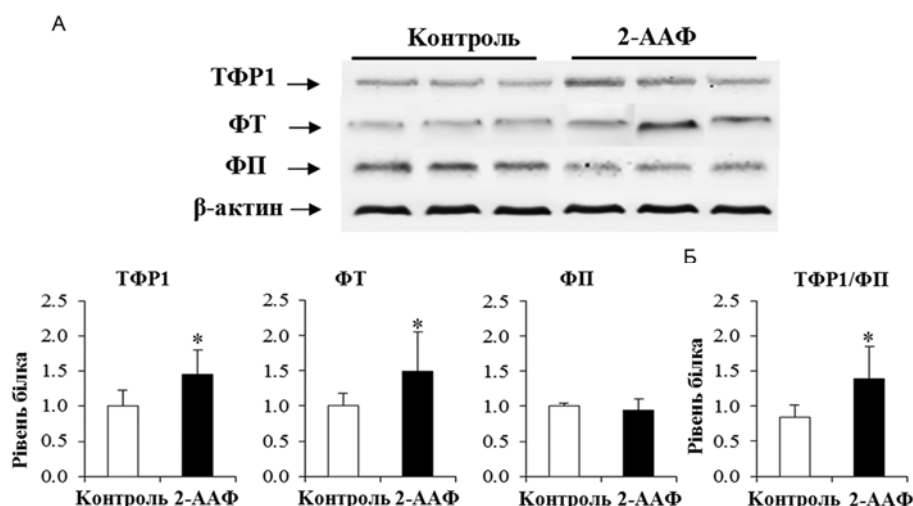


Рис. 2. Рівень білка ТФР1, ФТ і ФП (А) та співвідношення ТФР1/ФП (Б) у переднеопластичних печінках щурів, які отримували 2-ААФ

ФП в печінці щурів, які отримували 2-ААФ. На **рис. 2А** показано, що рівень білка ТФР1 і ФТ у передпухлинних печінках щурів, які отримували 2-ААФ був значно збільшений. Відомо, що ген *Tfrr1* кодує рецептор трансферину 1 (ТФР1) [11], який відповідає за надходження трансферинвмісного заліза, головного джерела негемового заліза, в більшість клітин [12]. На відміну від цього, рівень ФП, основного клітинного білка-експортера заліза [10], не змінювався (рис. 2А). Це призвело до значного збільшення співвідношення ТФР1/ФП у передпухлинній тканині печінки (**рис. 2Б**), що може вказувати на накопичення заліза у печінці щурів, які отримували 2-ААФ.

Схожі дані були показані в роботі Mizukami та співавт., 2010 [13], які показали підвищену експресію *Tfrr1* в глутатіон-S-трансферази-Р1-позитивних осередках у щурів, після лікування фенбендазолом, хімічною речовиною, що сприяє виникненню пухлини.

Відомо, що феритин є основним білком системи депонування іонів заліза та найбільш інформативним індикатором запасу заліза в організмі [14], рівень експресії якого був підвищений в нашому дослідженні. В декількох дослідженнях було показано, що збільшення концентрації заліза в печінці є причиною підвищення експресії *ФТ* [14], також як і рівня феритину [15].

Висновки. Серед відомих білків, які регулюють обмін заліза, ТФР1, ФТ і ФП у нашому дослідженні зазнали найбільших змін. Таким чином, результати нашої роботи вказують на порушення регуляції клітинного метаболізму заліза за дії гепатотоксиканту та гепатокарциногену 2-ААФ, і ці зміни спрямовані на накопичення заліза у клітинах печінки.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження необхідні для розкриття молекулярних механізмів, які лежать в основі порушення обміну заліза в печінці, а також з'ясування ролі змін обміну заліза в канцерогенному ефекті досліджуваної речовини.

References

1. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci.* 2014; 19 (2): 164-74.
2. Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1852 (7): 1347-59. DOI: 10.1016/j.bbdis.2015.03.011.
3. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma: consider the population. *J Clin Gastroenterol.* 2013; 47: S2-6. DOI: 10.1097/MCG.0b013e3182872f29.
4. Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, Paik YK. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2002; 35 (6): 1459-66. DOI: 10.1053/jhep.2002.33204.
5. Hasan SK, Sultana S. Geraniol attenuates 2-acetylaminofluorene induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in the liver of Wistar rats. *Toxicol Mech Methods.* 2015; 25 (7): 559-73. DOI: 10.3109/15376516.2015.1070225.
6. Bagnyukova TV, Tryndyak VP, Montgomery B, Churchwell MI, Karpf AR, James SR, Muskhelishvili L, Beland FA, Pogribny IP. Genetic and epigenetic changes in rat preneoplastic liver tissue induced by 2-acetylaminofluorene. *Carcinogenesis.* 2008; 29 (3): 638-46. DOI: 10.1093/carcin/bgm303.

7. Adesanoye OA, Adekunle AE, Adewale OB, Mbagwu AE, Delima AA, Adefegha SA, Molehin OR, Farombi EO. Chemoprotective effect of *Vernonia amygdalina* Del. (Asteraceae) against 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Ind Health*. 2016; 32 (1): 47-58. DOI: 10.1177/0748233713498436.
8. Hasan SK, Khan R, Ali N, Khan AQ, Rehman MU, Tahir M, Lateef A, Nafees S, Mehdi SJ, Rashid S, Shahid A, Sultana S. 18-β Glycyrrhetic acid alleviates 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity in Wistar rats: Role in hyperproliferation, inflammation and oxidative stress. *Hum Exp Toxicol*. 2015; 34 (6): 628-41. DOI: 10.1177/0960327114554045.
9. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008; 3: 1101-8.
10. De Domenico I, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin and ferroportin: the new players in iron metabolism. *Semin Liver Dis*. 2011; 31 (3): 272-9. DOI: 10.1055/s-0031-1286058.
11. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36 (11): 2137-43. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.02.007.
12. Zhang D, Meyron-Holtz E, Rouault TA. Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18 (2): 401-6. DOI: 10.1681/ASN.2006080908.
13. Mizukami S, Ichimura R, Kemmochi S, Taniai E, Shimamoto K, Ohishi T, Takahashi M, Mitsumori K, Shibutani M. Induction of GST-P-positive proliferative lesions facilitating lipid peroxidation with possible involvement of transferrin receptor up-regulation and ceruloplasmin down-regulation from the early stage of liver tumor promotion in rats. *Arch Toxicol*. 2010; 84 (4): 319-31. DOI: 10.1007/s00204-009-0496-x.
14. Ahmad S, Moriconi F, Naz N, Sultan S, Sheikh N, Ramadori G, Malik IA. Ferritin L and ferritin H are differentially located within hepatic and extra hepatic organs under physiological and acute phase conditions. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6 (4): 622-9.
15. Zhang D, Meyron-Holtz E, Rouault TA. Renal iron metabolism: transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18 (2): 401-6. DOI: 10.1681/ASN.2006080908.

УДК 616.36+616-006.6+546.72+616-092.9

ВЛИЯНИЕ ГЕПАТОТОКСИНА И ГЕПАТОКАНЦЕРОГЕНА 2-АЦЕТИЛАМИНОФЛУОРЕНА НА ОБМЕН ЖЕЛЕЗА В ПЕЧЕНИ КРЫС

Киндрат И. П., Ерстенюк А. М.

Резюме. Данные последних лет показывают, что нарушение обмена железа играет важную роль в развитии и прогрессировании хронических заболеваний печени, и является неотъемлемой составляющей канцерогенеза. Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) - одно из наиболее распространенных быстро прогрессирующих онкологических заболеваний печени. Важную роль в развитии ГЦК отводится хроническим заболеваниям печени, связанных с гемохроматозом, фиброзом, циррозом и алкоголизмом. Имеющиеся данные показывают, что измененный метаболизм железа играет важную роль в развитии и прогрессировании гепатоцеллюлярной карциномы. Однако, на сегодняшний день отсутствует убедительная информация о механизмах данного нарушения регуляции за действия гепатотоксинов и гепатоканцерогенов.

Учитывая это, мы исследовали влияние гепатотоксина и гепатоканцерогена - 2-ацетиламинофлуорена (2-ААФ) на метаболизм железа в печени крыс линии Спрег-Дуули. В нашем исследовании мы показали, что 2-ААФ вызвал изменения в уровне белка и экспрессии генов, кодирующих белки обмена железа, в частности в регуляции экспрессии трансферинового рецептора 1 (*Tfrr1*), легких цепей ферритина (*Fm*) и ферропортина (*Fp*). Данные изменения способствовали накоплению железа в клетках печени предраковых крыс, получавших 2-ААФ в течение 24 недель.

Таким образом, данные результаты исследований указывают на нарушение регуляции обмена железа в печени крыс при канцерогенезе печени.

Ключевые слова: обмен железа, карцинома, печень.

UDC 616.36+616-006.6+546.72+616-092.9

Effect of Hepatotoxin and Hepatocarcinogen 2-Acetylaminofluorene on the Iron Metabolism in Rat Liver

Kindrat I., Erstenyuk G.

Abstract. Liver is the central detoxification organ and main regulator of systemic iron homeostasis and storage. Iron is an essential micronutrient for almost all organisms. Iron plays a vital role in numerous biological processes, such as oxygen metabolism, mitochondrial energy metabolism, hematopoiesis, muscle function, production of enzymes responsible for cell growth and differentiation, DNA replication and repair. On the other hand, iron is a bioactive element, which promotes the formation of reactive oxygen species. Increased iron stores may lead to DNA strand breaks, protein fragmentation, DNA adducts formation, oxidation of proteins and lipids, factors that promote cell necrosis and apoptosis development.

Primary liver cancer is one of the most common causes of cancer-related death worldwide. The main risk factors that account for most hepatocellular carcinoma (HCC) cases are chronic viral hepatitis B and C infection, cirrhosis, liver fibrosis, chemical exposure, alcohol consumption, obesity, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In recent years, it has become increasingly evident that alterations in systemic and intracellular iron homeostasis play an important role in HCC development and progression. However, there is a lack of conclusive information regarding the hepatotoxins and hepatocarcinogens influence on the status of hepatic iron metabolism and mechanisms of their action. Based on these considerations, in current study, we investigated 2-acetylaminofluorene (2-AAF) effect on the iron metabolism status in the livers of Sprague-Dawley rats.

The aromatic amine 2-AAF is a potent mutagen and carcinogen causing tumors in various species and tissues, including liver. 2-AAF shows genotoxic (genetic) and non-genotoxic (epigenetic) effects. Conversion of 2-AAF to N-sulfonoxo-2-acetylaminofluorene (acetylaminofluorene-N-sulfate), which appears to be the main carcinogenic metabolite in rat liver, leads to formation of non-enzymatic reaction with nucleophilic sites on proteins and nucleic acids. Non-genotoxic ability of 2-AAF to induce chronic liver toxicity and cellular homeostasis disturbance, may also play important role in tumors development and progression.

In our study, using quantitative reverse transcription-PCR techniques and Western blot analysis, we showed that treatment of male Sprague-Dawley rats with 0.02% of 2-AAF for 24 weeks increased the expression of iron metabolism-related genes, transferrin receptor 1 (*Tfrc*) and ferritin light chain (*Ftl*), while the level of ferroportin (*Fpn1*) mRNA was decreased. In the mammalian cells, especially in hepatocytes, TFRC and FTL play the major role in iron uptake and storage, when FPN1 is an important iron exporter. Additionally, exposure of rats to 2-AAF resulted in an increase of TFRC and FTL protein level. In contrast, the level of FPN1 did not change in the liver of 2-AAF-treated rats. This resulted in an elevation of TFRC/FPN1 ratio, a condition that favors an accumulation of iron in the preneoplastic livers.

Thus, the findings of the presented study demonstrate extensive alterations of hepatic iron metabolism, and these dysregulation may be involved in the pathogenesis and mechanism of chemical-induced liver carcinogenicity. These results may provide a basis for the developing of mechanism-based preventive strategies for chemical-mediated liver cancer and pathologies.

Keywords: iron metabolism, cancer, liver.

Стаття надійшла 26.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування