

СТАТЬЯ

УДК 611.36:575.113:547.391.1:57.084

**ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ
АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В ПЕЧЕНИ КРЫС В ОТВЕТ
НА ОСТРОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВЫСОКИХ ДОЗ АКРИЛАМИДА****Репина Э.Ф., Рябова Ю.В., Якупова Т.Г.,
Хуснутдинова Н.Ю., Хмель А.О., Ахмадеев А.Р.***ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека»,
Уфа, e-mail: e.f.repina@bk.ru*

Целью исследования являлось изучение транскрипционной активности генов *Sod1*, *Nqo1* и *Nfe2l2* в ткани печени крыс при остром воздействии высоких доз акриламида и на фоне профилактической коррекции. В эксперименте использованы аутбредные крысы женского пола. Проведен анализ изменений транскрипционной активности генов, принимающих непосредственное участие в антиоксидантной защите организма, через 24 ч после однократного внутрижелудочного введения акриламида в дозе 150 мг/кг массы тела, а также на фоне профилактического внутрижелудочного введения комплексных соединений оксиметилурацила с аскорбиновой кислотой, сукцинатом натрия и ацетилцистеином. Проведенные исследования показали, что доза 150 мг/кг массы тела акриламида при однократном поступлении для крыс-самок находится на уровне ниже среднесмертельной. Изменение транскрипционной активности генов *Sod1* и *Nfe2l2* позволяет отнести их к маркерам наиболее раннего нарушения окислительно-восстановительного баланса в организме. Изменение экспрессии гена *Nqo1* в ранние сроки после токсического воздействия носило неоднозначный характер. Наибольший протекторный антиоксидантный эффект, по сравнению с другими комплексными соединениями, при воздействии высоких доз акриламида, проявило комплексное соединение оксиметилурацила с ацетилцистеином.

Ключевые слова: акриламид, острое воздействие, крысы, транскрипционная активность, гены, печень, коррекция, антиоксидантный эффект

**CHANGES IN TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF ANTIOXIDANT
PROTECTION GENES IN THE LIVER OF RAT IN RESPONSE
TO ACUTE EXPOSURE TO HIGH DOSES OF ACRYLAMIDE****Repina E.F., Ryabova Yu.V., Yakupova T.G.,
Khusnutdinova N.Yu., Khmel A.O., Akhmadeev A.R.***Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology,
Ufa, e-mail: e.f.repina@bk.ru*

The aim of the present research was to study the transcriptional activity of the *Sod1*, *Nqo1* and *Nfe2l2* genes in the liver tissue of rats exposed to acute high doses of acrylamide and during prophylactic correction. Outbred female rats were used in the experiment. An analysis of changes in the transcriptional activity of genes directly involved in the antioxidant defense of the body was carried out 24 hours after a single intragastric administration of acrylamide at a dose of 150 mg/kg body weight, as well as during prophylactic intragastric administration of complex compounds of oxymethyluracil with ascorbic acid, sodium succinate and acetylcysteine. The studies showed that a single dose of 150 mg / kg body weight of acrylamide for female rats is below the median lethal level. Changes in the transcriptional activity of the *Sod1* and *Nfe2l2* genes allow us to classify them as markers of the earliest disturbance of the redox balance in the body. Changes in *Nqo1* gene expression in the early stages after toxic exposure were ambiguous. The greatest protective antioxidant effect, compared with other complex compounds, when exposed to high doses of acrylamide, was demonstrated by the complex compound of oxymethyluracil with acetylcysteine.

Keywords: acrylamide, acute exposure, rats, transcriptional activity, genes, liver, correction, antioxidant effect

Введение

Акриламид (АА) – производственный токсикант. Кроме того, он может поступать в организм с пищевыми продуктами, содержащими крахмал, которые подвергались термической обработке выше 120°C [1, 2]. Токсичность АА для различных систем организма достаточно детально изучена [3, 4]. Экспериментально доказана его гепатотоксичность [5, 6]. Показано, что длительное воздействие АА снижает активность ферментов печени и повышает уровень по-

казателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) [7]. Некоторые авторы считают, что это связано с подавлением АА активности антиокислительных ферментов клетки [8].

Ядерный транскрипционный фактор *Nfe2l2* отвечает за поддержание клеточного окислительно-восстановительного баланса за счет регуляции экспрессии ключевых генов антиоксидантных и детоксикационных ферментов [9]. Связывание *Nfe2l2* с последовательностью ARE в регуляторной области генов-мишеней активирует каскад ре-

акций, которые обеспечивают защиту клеток от воздействия активных кислородных радикалов [10]. Ген *Nqo1* также оказывает защитное влияние на клетки от окислительного стресса [11, 12]. Ключевым компонентом антиоксидантной защиты организма, нейтрализующей постоянно образующиеся активные формы кислорода, являются супероксиддисмутазы (СОД). Ген *Sod1* кодирует фермент супероксиддисмутазу-1 (СОД1), принимающий непосредственное участие в антиоксидантном ответе клеток [13].

В литературе чаще описываются симптомы хронического воздействия АА, однако имеются сведения и об острых отравлениях, связанных с его пероральным приемом [14]. Поскольку вероятность контакта человека с данным токсикантом достаточно велика, особенно в быту, актуально дальнейшее проведение фундаментальных исследований по детализации механизмов его токсического действия и возможности медикаментозной коррекции последнего.

Цель исследования – изучить транскрипционную активность генов *Sod1*, *Nqo1* и *Nfe2l2* в ткани печени крыс при остром воздействии высоких доз акриламида и на фоне профилактической коррекции.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 30 аутбредных крысах-самках с массой тела, равной 189–194 г в начале эксперимента. Животные были разделены на 5 групп: 1 – группа, которая не подвергалась какому-либо воздействию (К-, отрицательный контроль), 2 – группа, подвергшаяся воздействию АА (К+, положительный контроль), 3 – группа, подвергшаяся воздействию АА на фоне приема комплексного соединения оксиметилурацила с аскорбиновой кислотой (МГ-1) в дозе 50 мг/кг массы тела (АА+МГ1), 4 – группа, подвергшаяся воздействию АА на фоне приема комплексного соединения оксиметилурацила с сукцинатом натрия (МГ-2) в дозе 50 мг/кг массы тела (АА+МГ-2), 5 – группа, подвергшаяся воздействию АА на фоне приема комплексного соединения оксиметилурацила с ацетилцистеином (МГ-10) в дозе 500 мг/кг массы тела (АА+МГ-10).

Животные 3–5 групп внутрижелудочно получали комплексные соединения оксиметилурацила первые 5 дней эксперимента, животным 1 и 2 группы вводили аналогично эквивалентные объемы дистиллированной воды. Через 1 ч после последнего введения корректирующего препарата крысам 2–5 групп вводили внутрижелудочно АА в дозе 150 мг/кг массы тела.

Через 24 ч после введения токсиканта была оценена летальность животных и про-

ведена эвтаназия выживших. Образцы печени для генетических исследований замораживали в жидком азоте и заливали реагентом Extract RNA, затем проводили выделение суммарной РНК. Для синтеза кДНК использовали набор готовых реагентов («Евроген», Россия). Определение транскрипционной активности генов проводили в режиме реального времени методом ПЦР на амплификаторе Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия).

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 21.0 (IBM, USA). Критерий Колмогорова – Смирнова использовали в качестве критерия нормальности распределения признаков по группам. Для оценки значимости различий между группами использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорные критерии Тьюки и Тамхейна. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Данные по гибели животных по группам приведены в таблице.

Данные по летальности крыс, доза 150 мг/кг массы тела

Группы животных	Количество животных в группе	Количество павших животных
К -	6	0
К +	6	1
АА + МГ1	6	1
АА + МГ2	6	2
АА + МГ10	6	0

Из представленных данных видно, что доза 150 мг/кг массы тела при однократном поступлении оказалась практически ниже среднесмертельной для крыс-самок. Вместе с тем только в группе, получавшей в профилактическом режиме препарат МГ-10, все животные остались живы, как и в группе отрицательного контроля.

Полученные авторами результаты свидетельствуют об активации системы антиоксидантной защиты клеток печени после воздействия АА, что согласуется с данными литературы [7, 8]. Об этой активации судили по изменению уровня экспрессии гена *Nfe2l2*, который запускает каскад реакций, связанных с антиоксидантной защитой [10]. Проведенный анализ биостатистических данных выявил значимые диспаратности в средней интенсивности транскрипции гена *Nfe2l2* в тканях печени (рис. 1) между груп-

пами К- и АА+МГ1 ($F = 5,42, p = 0,0068$). Максимальный индекс экспрессии гена ($-0,14 \pm 0,14$) отмечен в контрольной группе К-. Минимальная экспрессия была зафиксирована в группе АА+МГ1 ($-1,07 \pm 0,40$). В экспериментальной группе К+ наблюдался показатель экспрессии $-0,74 \pm 0,29$, еще ниже он зафиксирован в группе АА+МГ-2 ($-1,07 \pm 0,40$). Ближе всего к данным группы отрицательного контроля находилась экспрессия гена *Nfe2l2* в группе АА+МГ10 ($-0,11 \pm 0,22$).

Уровень экспрессии гена *Sod1*, кодирующего фермент супероксиддисмутазу 1, который катализирует дисмутацию супероксид-анионов в перекись водорода и кислород [13], также продемонстрировал изменения. При анализе транскрипционной активности гена *Sod1* было установлено следующее: самый высокий уровень экспрессии наблюдался в контрольной группе К- ($0,09 \pm 0,25$), в группе положительного контроля К+ он был ниже ($-0,78 \pm 0,37$), еще ниже – в группах АА+МГ-1 ($-1,26 \pm 0,32$) и АА+МГ-2 ($-1,59 \pm 0,33$), и только в группе АА+МГ-10 экспрессия стал выше ($-0,47 \pm 0,35$), но различия не имели статистической значимости. Значимыми ($F = 7,71, p = 0,0013$) были лишь различия между экспрессией гена в группах АА+МГ-2 и К- (рис. 2).

Разница в средней интенсивности экспрессии гена *Nqo1* в печени, кодирующего фермент NAD(P)H: убихиноноксидоредуктазу 1, который также играет ключевую роль в защите клетки против окислительного стресса (рис. 3), между изучаемыми группами не достигла статистической значимости ($F = 0,89, p = 0,4617$). Самый низкий уровень экспрессии был зафиксирован в контрольной группе К- ($0,25 \pm 0,35$), в то время как самый высокий уровень наблюдался в группе АА+МГ10 ($1,07 \pm 0,21$). В группе К+ уровень экспрессии гена *Nqo1* ($0,30 \pm 0,51$) был слегка выше по сравнению с группой К-. В группе АА+МГ1 уровень экспрессии составил $0,83 \pm 0,29$, а в группе МГ2 – $0,8 \pm 0,45$. Экспрессия гена *Nqo1* в группе АА+МГ10 была самой высокой и составила $1,07 \pm 0,21$.

Молекулярные механизмы токсичности АА основаны на нескольких патогенетических путях, включая развитие окислительного стресса, индукцию апоптоза и воспалительную реакцию [15, с. 113696]. Некоторые химические агенты, обладая антиоксидантными свойствами и способностью модулировать внутриклеточные сигнальные пути, могут вмешиваться в эти процессы, тем самым снижая выраженность токсического воздействия АА.

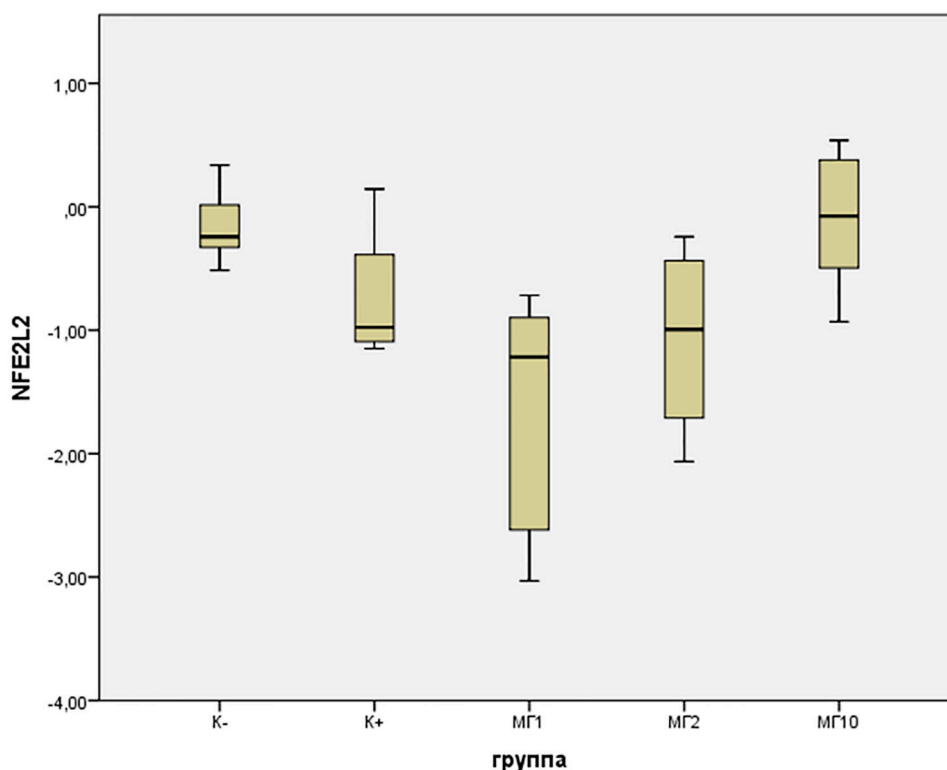


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *Nfe2l2* в ткани печени крыс-самок при экстремальном воздействии акриламида и профилактической коррекции комплексными соединениями оксиметилурацила

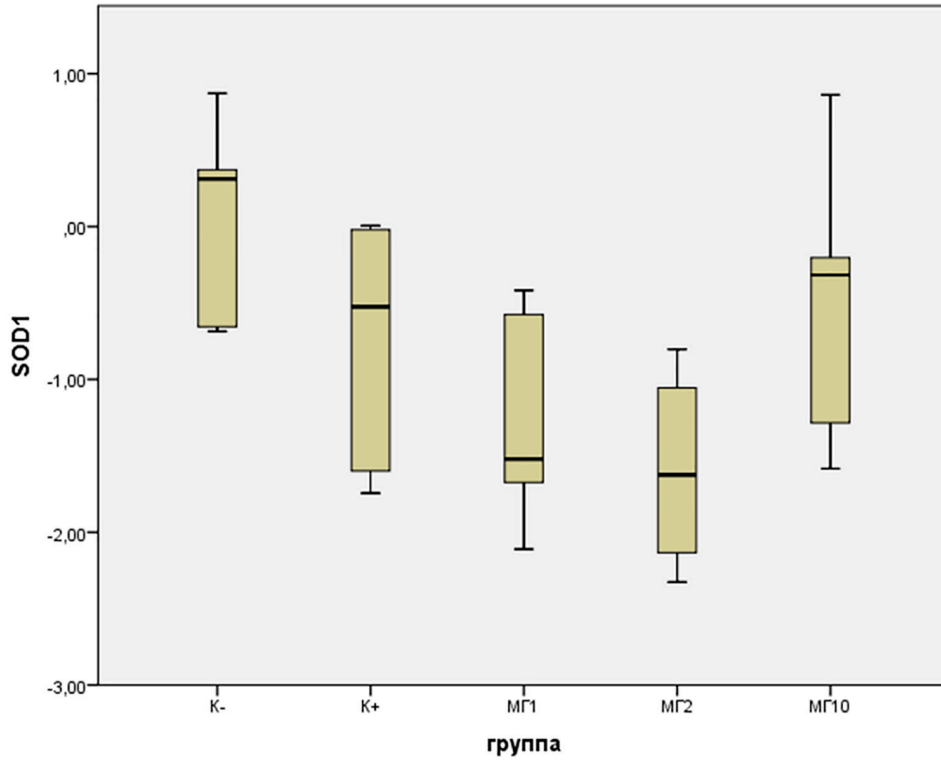


Рис. 2. Уровень экспрессии гена Sod1 в ткани печени крыс-самок при экстремальном воздействии акриламида и профилактической коррекции комплексными соединениями оксиметиурацила

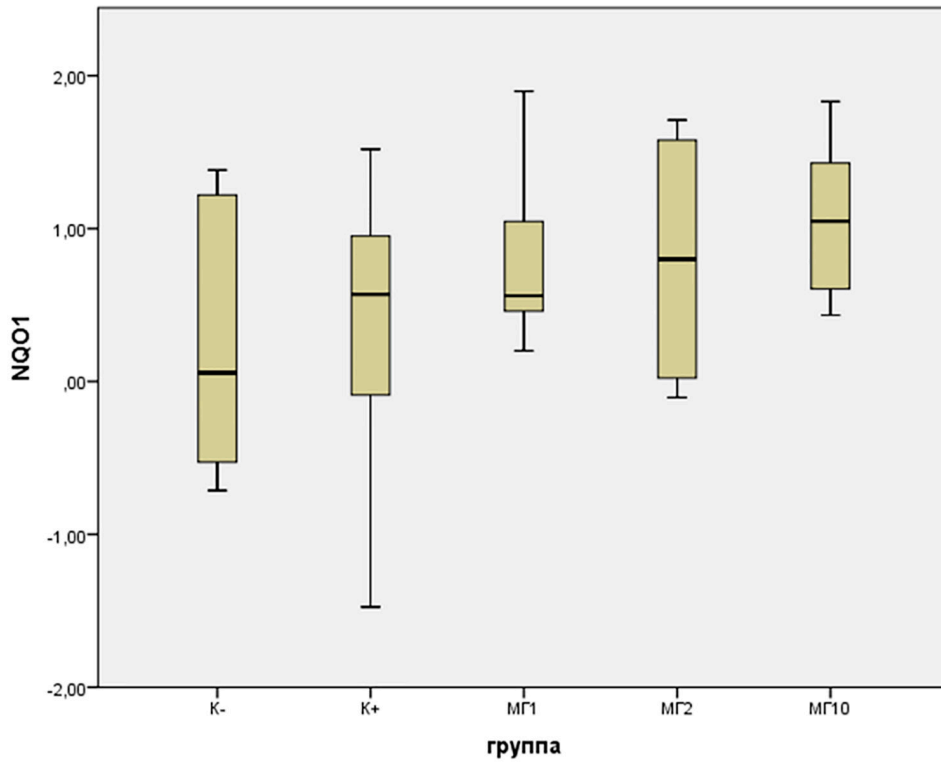


Рис. 3. Уровень экспрессии гена Nqo1 в ткани печени крыс-самок при экстремальном воздействии акриламида и профилактической коррекции комплексными соединениями оксиметиурацила

Согласно проведенным исследованиям, МГ-1, содержащий аскорбиновую кислоту, которая по неясным механизмам оказывает положительное влияние на состояние организма при воздействии АА [15], а также МГ-2, оказались менее эффективными в защите клеток от токсического действия АА по сравнению с МГ-10.

Предполагается, что выраженный протекторный эффект МГ-10 связан с его разнонаправленным защитным действием. Ацетилцистеин, входящий в состав МГ-10, с одной стороны, проявляет антиоксидантное действие за счет способности реактивных сульфгидрильных групп связываться с окислительными радикалами и нейтрализовать их. С другой стороны, он способствует синтезу глутатиона. Кроме того, ацетилцистеин известен своим защитным действием против воспалительных процессов, апоптоза и окислительного повреждения, индуцированного АА [15].

Заключение

Проведенные исследования показали, что при однократном поступлении доза 150 мг/кг массы тела акриламида для крыс-самок находится на уровне ниже средне-смертельной. По показателю летальности наиболее заметный защитный эффект проявил препарат МГ-10 – в данной группе все животные остались живы.

Транскрипционная активность гена *Sod1* под воздействием акриламида снизилась. Еще ниже она оказалась в группах, получавших препараты МГ-1 и МГ-2. Профилактическое введение препарата МГ-10 проявилось в меньшем снижении экспрессии гена по сравнению с группой отрицательного контроля. Изменение активности гена *Nfe2l2* по группам имело такую же направленность. Динамика активности гена *Nqo1* была иной: во всех группах крыс, получавших акриламид, она стала выше, чем в группе отрицательного контроля.

Таким образом, гены *Sod1* и *Nfe2l2* можно отнести к маркерам наиболее раннего нарушения окислительно-восстановительного баланса в организме.

Наибольший протекторный антиоксидантный эффект проявляет комплексное соединение оксиметилурацила с ацетилцистеином (МГ-10).

Список литературы

1. Wei T., Zhang D., Chen L. The kinetics study and reaction mechanism of acrylate grouting materials // *Bulg. Chem. Commun.* 2015. Is. 47. P. 89–92.
2. Kumar J., Das S., Teoh S.L. Dietary Acrylamide and the Risks of Developing Cancer: Facts to Ponder // *Front Nutr.* 2018. Vol. 28, Is. 5. P. 14.
3. Koszucka A., Nowak A., Nowak I., Motyl I. Acrylamide in human diet, its metabolism, toxicity, inactivation and the associated. European Union legal regulations in food industry // *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020. Vol. 60, Is. 10. P. 1677–1692.
4. Semla M., Goc Z., Martiniaková M., Omelka R., Formicki G. Acrylamide: a common food toxin related to physiological functions and health // *Physiol Res.* 2017. Vol. 66, Is. 2. P. 205–217.
5. Gedik S., Erdemli M.E., Gul M., Yigitcan B., Bag H.G., Aksungur Z., Altinoz E. Hepatoprotective effects of crocin on biochemical and histopathological alterations following acrylamide-induced liver injury in Wistar rats. *Biomed Pharmacother.* 2017. No. 95. P. 764–770.
6. Ghorbel I., Elwej A., Chaabene M., Boudawara O., Marakchi R., Jamoussi K., Boudawara T.S., Zeghal N. Effects of acrylamide graded doses on metallothioneins I and II induction and DNA fragmentation: Biochemical and histomorphological changes in the liver of adult rats // *Toxicol Ind Health.* 2017. Vol. 33, Is. 8. P. 611–622.
7. Kim S.M., Baek J.M., Lim S.M., Kim J.-Y., Kim J., Choi I., Cho K.-H. Modified lipoproteins by acrylamide showed more atherogenic properties and exposure of acrylamide induces acute hyperlipidemia and fatty liver changes in zebrafish // *Cardiovasc. Toxicol.* 2015. Vol. 15, Is. 4. P. 300–308.
8. Тарских М.М. Молекулярно-клеточные механизмы в патогенезе болезней, обусловленных воздействием акрилатов: автореф. дис. ... докт. мед. наук. Иркутск, 2014. 44 с.
9. Mitsuishi Y., Motohashi H., Yamamoto M. The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism // *Frontiers in oncology.* 2012, Is. 2. P. 200.
10. Ma Q. Role of *Nrf2* in oxidative stress and toxicity // *Annual review of pharmacology and toxicology.* 2013. No. 53. P. 401–426.
11. Zhang X., Han K., Yuan D., Meng C. Overexpression of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and induced apoptosis by activating AMPK/PGC-1 α pathway // *DNA and cell biology.* 2017. Vol. 36, Is. 4. P. 256–263.
12. Bona S., Moreira A.J., Rodrigues G.R., Cerski C.T., Da Silveira T.R., Marroni C.A., Marroni N.P. Diethylnitrosamine-induced cirrhosis in Wistar rats: an experimental feasibility study // *Protoplasma.* 2015. Vol. 252, Is. 3. P. 825–833.
13. Okado-Matsumoto A., Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria // *J Biol Chem.* 2001. Vol. 276, Is. 42. P. 38388–38393.
14. Yamamoto R., Yasuoka T., Matsushima J., Tsubouchi Y., Kanazashi H., Sakurai K., Hanazawa T., Kamijo Y., Akieda K. Acute acrylamide poisoning with severe symptoms in a short time: a case report // *International Journal of Emergency Medicine.* 2023. Vol. 16, Is. 1. P. 41.
15. Yan F., Wang L., Zhao L., Wang C., Lu Q., Liu R. Acrylamide in food: Occurrence, metabolism, molecular toxicity mechanism and detoxification by phytochemicals // *Food Chem Toxicol.* 2023. Is. 175. P. 113696.