

Статья поступила в редакцию 30.01.2023 г.

DOI: 10.24412/2687-0053-2023-2-81-85

EDN: QVWYU

Информация для цитирования:

Якупова Т.Г., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю., Репина Э.Ф., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф. ОСОБЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ АКРИЛАМИДОМ // Медицина в Кузбассе. 2023. №2. С. 81-85.

Якупова Т.Г., Каримов Д.О., Хуснутдинова Н.Ю., Репина Э.Ф., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф.

Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека,

г. Уфа, Россия



ОСОБЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ АКРИЛАМИДОМ

Цель исследования – изучить особенности экспрессии генов окислительного стресса при длительном воздействии акриламида.

Материалы и методы. Исследования выполнены на белых аутбредных крысах самках с исходной массой тела 190-192 г. С целью профилактической коррекции растворы соединений вводили животным внутрижелудочно за 1 час до токсиканта: МГ-1 и МГ-2 – 0,5 % водный раствор в дозе 50 мг/кг массы тела; МГ-10 – 5 % водный раствор в дозе 500 мг/кг массы тела. В качестве токсиканта использовали 0,2 % водный раствор акриламида.

Синтез кДНК проводили с матрицы выделенной тотальной РНК. Изучение экспрессии генов в норме и при интоксикации акриламидом проводилось методом ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. Ген *CASP7* показал статистически значимые различия ($k = 10,07$; $p = 0,039$). Минимальное значение данного гена было в интактной группе $-0,46 [-1,49; 2,06]$, а максимальное – в группе МГ-10 $3,87 [2,26; 8,32]$. Уровень экспрессии гена *CHEK* ($k = 12,73$; $p = 0,013$) достиг своего максимального значения в группе профилактической коррекции МГ-10 ($4 [-0,07; 8,49]$), а минимального – в группе МГ-2 ($-0,8 [-0,96; -0,33]$). Минимальное значение гена *RIPK* было в группе отрицательного контроля $-0,18 [-0,57; 0,69]$, а максимальное $3,46 [2,02; 6,33]$ в группе МГ-10. Статистическая значимость была достигнута при сравнении групп отрицательного и положительного контроля с группами МГ-2 и МГ-10.

Заключение. Воздействие акриламида способствует повышению в ткани печени экспрессии основных генов детоксикации и защиты клетки от повреждений. Акриламид в дозе 20 мг/кг массы тела животных в условиях подострого эксперимента оказывает не сильно выраженное токсическое действие на организм, выражающееся в изменении генетических показателей.

Ключевые слова: гены; экспрессия; печень; акриламид; токсический гепатит

Yakupova T.G., Karimov D.O., Khusnutdinova N.Yu., Repina E.F., Valova Ya.V., Mukhammadiyeva G.F.

Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia

THE PECULIARITY OF GENE EXPRESSION IN TOXIC LIVER DAMAGE WITH ACRYLAMIDE

The purpose of the study – to study the features of the expression of oxidative stress genes under prolonged exposure to acrylamide.

Materials and methods. The studies were performed on white outbred female rats with an initial body weight of 190-192 g. For the purpose of preventive correction, solutions of compounds were administered intragastrically to animals 1 hour before the toxicant: MG-1 and MG-2 – 0.5 % aqueous solution at a dose of 50 mg/kg body weight; MG-10 – 5 % aqueous solution at a dose of 500 mg/kg of body weight. A 0.2 % aqueous solution of acrylamide was used as a toxicant.

cDNA synthesis was performed from a matrix of isolated total RNA. The study of gene expression in normal and during acrylamide intoxication was carried out by real-time PCR.

Results. The *CASP7* gene showed statistically significant differences ($k = 10.07$; $p = 0.039$). The minimum value of this gene was $-0.46 [-1.49; 2.06]$ in the intact group, and the maximum value was $3.87 [2.26; 8.32]$ in the MG-10 group. The expression level of the *CHEK* gene ($k = 12.73$; $p = 0.013$) reached its maximum value in the group of preventive correction MG-10 ($4 [-0.07; 8.49]$), and the minimum is in the MG group-2 ($-0.8 [-0.96; -0.33]$). The minimum value of the *RIPK* gene was $-0.18 [-0.57; 0.69]$ in the negative control group, and the maximum value was $3.46 [2.02; 6.33]$ in the MG-10 group. Statistical significance was achieved when comparing the negative and positive control groups with the MG-2 and MG-10 groups.

Conclusion. The effect of acrylamide increases the expression of the main detoxification genes in the liver tissue and protects the cell from damage. Acrylamide at a dose of 20 mg/kg of animal body weight in a subacute experiment has a mild toxic effect on the body, expressed in a change in genetic parameters.

Key words: genes; expression; liver; acrylamide; toxic hepatitis

Возрастающая химическая нагрузка приводит к росту неинфекционной заболеваемости и преждевременной смертности населения, как работающего, так и проживающего в неблагоприятных экологических условиях [1]. По данным Всемирной

Организации Здравоохранения (ВОЗ), в мире более 2 миллиардов человек страдают различными заболеваниями печени. Акриламид (2-пропенамид) – амид акриловой кислоты является мономером, при-

меняемым в производстве полимеров — полиакриламидами. Акриламид растворим в воде, этаноле, ацетоне, мало растворим в бензоле [2]. Акриламид токсичен, он поражает нервную систему, печень и почки, раздражает слизистые оболочки [3]. Средняя смертельная доза при внутрижелудочном поступлении для крыс составляет 149 мг/кг массы тела. Акриламид может образовываться в жареных или запеченных продуктах при температурах выше 180°C [4]. Проведенные исследования обнаружили акриламид в черных оливках, сушеных сливах, арахисе, жареном картофеле, кофе и других продуктах питания [5].

Известно, что всасывание акриламида происходит через кожные покровы, дыхательную и пищеварительную системы. После перорального поступления в организм крыс акриламид был обнаружен в разных тканях. Наибольшее количество этого соединения было обнаружено в мышцах (48 %), коже (15 %), крови (12 %) и печени (7 %), менее 1 % акриламида находилось в головном и спинном мозге [6]. Учитывая поступление токсиканта с продуктами питания и его потенциальное влияние на эндокринную и репродуктивную системы, актуальным является проведение дальнейших исследований для понимания молекулярных механизмов его действия и возможных последствиях для здоровья человека.

Кроме того, в доступной литературе недостаточно отражены сведения о гепатотоксичности акриламида, о почечно-печеночных взаимодействиях при детоксикации организма [7]. Оксиметилурацил и производные на его основе проявляют двойной фармакологический эффект при интоксикациях: ингибируют свободнорадикальное окисление и оказывают прямое защитное действие на биологические мембраны. Однако они слабо влияют на процессы энергообразования в клетке. В то же время известно, что гипоксия часто сопровождается патологическими состояниями, в том числе индуцированные воздействием химических веществ [8]. Поэтому сочетанное применение производных оксиметилурацила с антигипоксантами дает лучший протекторный эффект. Установлено также, что при введении смертельных доз многих токсикантов оксиметилурацил 9 оказывает терапевтический эффект только в составе комплексной терапии, включающей антидотные средства (ацетилцистеин, α -токоферол и др.) [9].

Цель данного исследования — изучение особенности экспрессии генов окислительного стресса при длительном воздействии акриламида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на белых аутбредных крысах самках с исходной массой тела 190–192 г. Животные получали сухой сбалансированный комбикорм «Дельта Фидс» производства компании «БиоПро» (Россия) и воду в режиме неограниченного доступа. Методом случайной выборки крыс разделили на группы и содержали в клетках по

6 особей при температуре воздуха $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Группа 1 (К-) — отрицательный контроль; группа 2 (К+) — положительный контроль (только акриламид); группа 3 (МГ-1) — коррекция комплексным соединением оксиметилурацила (5-гидрокси-6-метилурацил) с аскорбиновой кислотой; группа 4 (МГ-2) — коррекция комплексным соединением оксиметилурацила (5-гидрокси-6-метилурацил) с сукцинатом натрия; группа 5 (МГ-10) — коррекция комплексным соединением оксиметилурацила (5-гидрокси-6-метилурацил) с ацетилцистеином.

Комплексные соединения синтезированы в Уфимском Институте химии УФИЦ РАН. С целью профилактической коррекции токсических повреждений растворы соединений (на дистиллированной воде) вводили животным внутрижелудочно за 1 час до токсиканта: МГ-1 и МГ-2 — 0,5 % водный раствор в дозе 50 мг/кг массы тела; МГ-10 — 5 % водный раствор в дозе 500 мг/кг массы тела.

В экспериментах по изучению антигипоксических свойств было установлено, что они являются наиболее эффективными. В качестве токсиканта использовали 0,2 % водный раствор акриламида, носителем и контрольным веществом (отрицательный контроль) являлась дистиллированная вода. Через 1 час после комплексных соединений внутрижелудочно вводили акриламид в дозе 20 мг/кг массы тела, что по данным литературы составляет примерно 1/10 от ДЛ50. По описанной выше схеме эксперимент осуществляли 4 недели.

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека» (Протокол № 3 от 09.11.2022). Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей. Условия проведения и вывода животных из эксперимента осуществляли с соблюдением международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Животные выводились из эксперимента путем эвтаназии с помощью углекислого газа с последующей декапитацией.

Для анализа экспрессии генов кусочки почек сразу после декапитации и вскрытия замораживали в жидком азоте и заливали реагентом Extract RNA (ЗАО Евроген) для дальнейшего выделения РНК. Выделение тотальной (суммарной) РНК проводили согласно требованиям протокола. Синтез кДНК проводили с матрицы выделенной тотальной РНК с использованием набора реактивов MMLV RT kit и праймеров олиго(dT)15 («Евроген»). Изучение экспрессии генов в норме и при интоксикации акриламидом проводилось методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе Rotor-Gene Q («Qiagen») с использованием олигонуклеотидных специфичных праймеров и интеркалирующего красителя SYBR Green. Уровень экспрессии мРНК стандартизировали относительно экспрессии гена GAPDH — ген белка «домашнего хозяйства».

Статистическая обработка результатов исследования выполнена с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows» с помощью Н-критерия Краскела-Уоллиса для попарного сравнения групп. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Полученные результаты выражали в виде $Me [Q1; Q3]$, где Me – медиана, $Q1$ – 1-й квартиль, $Q3$ – 3-й квартиль.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные нами результаты представлены ниже (рис. 1).

При сравнении экспериментальных групп по уровню экспрессии гена *CASP7* были обнаружены статистически значимые различия ($\kappa = 10,07$; $p = 0,039$). Попарные сравнения исследуемых групп также показали значимые результаты. Так, значимость была достигнута при сравнении группы МГ-10 с группами отрицательного и положительно-го контроля и группой МГ-1 (0,003; 0,015 и 0,040, соответственно). Экспрессия изучаемого гена достигала своего минимального значения в интактной группе $-0,46 [-1,49; 2,06]$ и постепенно увеличивалась, достигая максимального значения в группе МГ-10 $3,87 [2,26; 8,32]$.

На рисунке 2 представлено изменение транскрипционной активности гена *CHEK*.

Данный эксперимент показал, что уровень экспрессии гена *CHEK* ($\kappa = 12,73$; $p = 0,013$) достиг своего максимального значения в группе профилактической коррекции МГ-10 ($4 [-0,07; 8,49]$), а минимального – в группе МГ-2 ($-0,8 [-0,96; -0,33]$). При попарных сравнениях исследуемых групп статистическая значимость была достигнута при сравнении группы профилактики МГ-2 с группами отрицательного контроля ($p = 0,042$), положительно-го контроля ($p = 0,006$) и с группой МГ-10 ($p = 0,003$), а также при сравнении групп МГ-1 и МГ-10 ($p = 0,039$).

Анализ представленности транскриптов гена *RIPK* при введении акриламида (рис. 3) показал следующие результаты ($\kappa = 13,15$; $p = 0,011$).

Минимальное значение изучаемого гена было в группе отрицательного контроля $-0,18 [-0,57; 0,69]$ и постепенно возрастало до значения $3,46 [2,02; 6,33]$ в группе МГ-10. Интересные результаты были получены при попарных сравнениях. Так, статистическая значимость была достигнута при сравнении групп отрицательного и положительного контроля с группами МГ-2 и МГ-10. Были получены следующие значения: κ -МГ-2 $p = 0,008$; κ +МГ-2 $p = 0,049$; κ -МГ-10 $p = 0,002$; κ +МГ-10 $p = 0,020$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время акриламид известен не только как синтетический материал, используемый в промышленности, но и как канцерогенное, цито- и генотоксичное соединение, которое образуется в процессе, вызванном нагреванием (из-за реакции

Рисунок 1

Экспрессия гена *CASP7* в печени крыс при подостром воздействии акриламида и профилактической коррекции комплексными соединениями оксиметилурацила

Figure 1

Expression of the *CASP7* gene in the liver of rats under subacute exposure to acrylamide and prophylactic correction with oxymethyluracil complex compounds

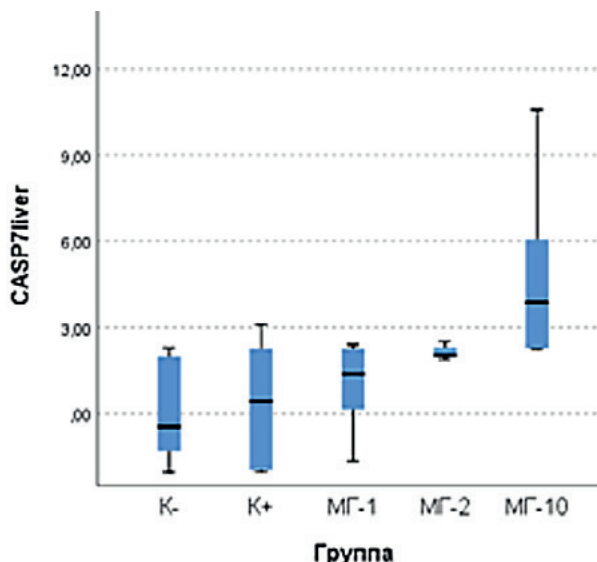
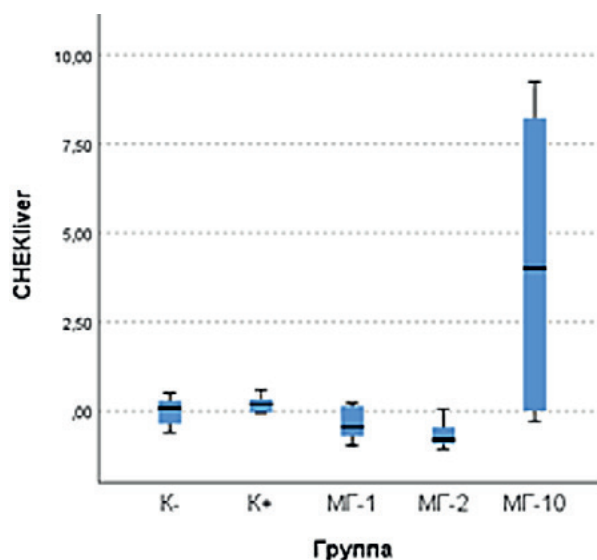


Рисунок 2

Экспрессия гена *CHEK* в печени крыс при подостром воздействии акриламида и профилактической коррекции комплексными соединениями оксиметилурацила

Figure 2

Expression of the *CHEK* gene in the liver of rats under subacute exposure to acrylamide and prophylactic correction with oxymethyluracil complex compounds



Майяра), в основном в пищевых продуктах, где его образование зависело от температуры [10-12].

По данным литературы, токсические эффекты акриламида опосредованы образованием генотоксических метаболитов, окислительным стрессом, нарушением распространения нервных сигналов, ультраструктурными и гистологическими дефектами в центральной нервной системе [13]. По данным многочисленных научных исследований по акриlamиду, он представляет серьезную угрозу для здоровья человека, что требует проведения дальнейших фундаментальных исследований [14].

Проведенные нами исследования в условиях подострого эксперимента (28 дней) в дозе 20 мг/кг массы тела животных свидетельствуют, что акриlamид в указанной дозе оказывает токсическое действие на организм [15].

Анализ экспрессии основных генов детоксикации и защиты клетки от повреждений в результате окислительного стресса показал, что воздействие акриламида способствовало повышению их экспрессии в ткани печени, что согласуется с данными литературы.

Профилактическое введение комплексных соединений оксиметилурацила оказало неоднозначное влияние на активность генов в ткани печени. Активность одних, таких как *CASP7*, *RIPK*, они еще больше повысили. На активность гена *CHEK* оказали положительное действие, снизив их активность. Более эффективными оказались комплексные соединения МГ-1 и МГ-2, по сравнению с МГ-10.

Информация о финансировании и конфликте интересов

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES:

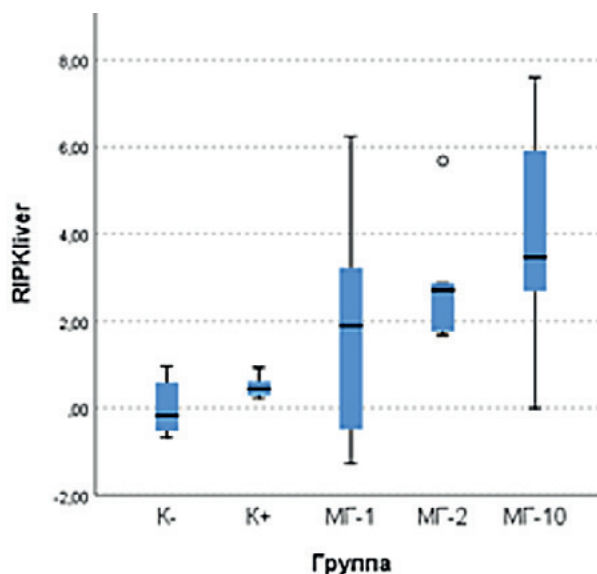
1. Wei T, Zhang D, Chen L. The kinetics study and reaction mechanism of acrylate grouting materials. *Bulg Chem Commun*. 2015; 47: 89-92. DOI: 10.1021/jf020302f
2. Lenze CJ, Peksa CA, Sun W, Hoeger IC, Salas C, Hubbe MA. Intact and broken cellulose nanocrystals as model nanoparticles to promote dewatering and fine-particle retention during papermaking. *Cellulose*. 2016; 23(6): 3951. DOI: 10.1007/s10570-016-1077-9
3. Cantrell MS, McDougal OM. Biomedical rationale for acrylamide regulation and methods of detection. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2021; 20(2): 2176-2205. DOI: 10.1111/1541-4337.12696
4. 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; 60(10): 1677-1692. DOI: 10.1080/10408398.2019.1588222
5. Gerhard E. Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure. *Arch Toxicol*. 2020; 94(9): 2939-2950. DOI: 10.1007/s00204-020-02893-1
6. Duan X, Wang Q-C, Chen K-L, Zhu C-C, Liu J, Sun S-C. Acrylamide toxic effects on mouse oocyte quality and fertility in vivo. *Scientific Reports*. 2015; 5: 11562. DOI: 10.1038/srep11562
7. Aras D, Cakar Z, Ozkavukcu S, Can A, Cinar O. In Vivo acrylamide exposure may cause severe toxicity to mouse oocytes through its metabolite glycidamide. *PLoS One*. 2017; 12(2): 26. DOI:10.1371/journal.pone.0172026
8. Li M, Sun J, Zou F, Bai S, Jiang X, Jiao R, Bai W. Glycidamide inhibits progesterone production through reactive oxygen species-induced apoptosis in R2C Rat Leydig Cells. *Food Chem Toxicol*. 2017; 108(Pt B): 563-570. DOI: 10.1016/j.fct.2016.09.035
9. Yilmaz BO, Yildizbayrak N, Aydin Y, Erkan M. Evidence of acrylamide- and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells. *Hum Exp Toxicol*. 2017; 36(12): 1225-1235. DOI: 10.1177/0960327116686818
10. Pelucchi C, Bosetti C, Galeone C, La Vecchia C. Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *Int J Cancer*. 2015; 136(12): 2912-2922. DOI: 10.1002/ijc.29339

Рисунок 3

Экспрессия гена RIPK в печени крыс при подостром воздействии акриламида и профилактической коррекции комплексными соединениями оксиметилурацила

Figure 3

Expression of the RIPK gene in the liver of rats under subacute exposure to acrylamide and prophylactic correction with oxymethyluracil complex compounds



11. LoPachin RM, Gavin T, Decaprio A, Barber DS. Application of the Hard and Soft, Acids and Bases (HSAB) theory to toxicant-target interactions. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25(2): 239-251. DOI: 10.1021/tx2003257
12. Matoso V, Bargi-Souza P, Ivanski F, Romano MA, Romano RM. Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chem.* 2019; 283: 422-430. DOI: 10.1016
13. Lipunova N, Schouten LJ, van den Brandt PA, Hogervorst JG. A prospective cohort study on dietary acrylamide intake and the risk for cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer Prev.* 2016; 26(6): 528-531. DOI: 10.1097/cej.0000000000000268
14. Bongers ML, Hogervorst JG, Schouten LJ, Goldbohm RA, Schouten HC, van den Brandt PA. Dietary acrylamide intake and the risk of lymphatic malignancies: the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *PLoS One.* 2012; 7(6): 380. DOI: 10.1371/journal.pone.0038016
15. Ziatdinova MM, Valova YaV, Mukhammadieva GF, Karimov DO, Yakupova TG, Khusnutdinova NYu, Repina EF. The effect of hepatoprotectors on the transcriptional activity of the GCLC gene in acute toxic hepatitis caused by various toxicants. *Occupational medicine and human ecology.* 2021; 4(28): 158-170. Russian (Зиатдинова М.М., Валова Я.В., Мухаммадиева Г.Ф., Каримов Д.О., Якупова Т.Г., Хуснутдинова Н.Ю., Репина Э.Ф. Влияние гепатопротекторов на транскрипционную активность гена GCLC при остром токсическом гепатите, вызванном различными токсикантами // Медицина труда и экология человека. 2021. № 4(28). С. 158-170.)

Сведения об авторах:

ЯКУПОВА Татьяна Георгиевна, младший научный сотрудник, отдел токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия. E-mail: tanya.kutlina.92@mail.ru

КАРИМОВ Денис Олегович, канд. мед. наук, заведующий отделом токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия. E-mail: karimovdo@gmail.com

ХУСНУТДИНОВА Надежда Юрьевна, научный сотрудник, отдел токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия. E-mail: h-n-yu@yandex.ru

РЕПИНА Эльвира Фаридовна, канд. мед. наук, старший научный сотрудник, отдел токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия. E-mail: e.f.repina@bk.ru

ВАЛОВА Яна Валерьевна, младший научный сотрудник, отдел токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия. E-mail: q.juk@ya.ru

МУХАММАДИЕВА Гузель Фанисовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, отдел токсикологии и генетики с экспериментальной клиникой лабораторных животных, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», г. Уфа, Россия. E-mail: ufnimt@mail.ru

Information about authors:

YAKUPOVA Tatyana Georgievna, junior researcher, department of toxicology and genetics with experimental clinic for laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia. E-mail: tanya.kutlina.92@mail.ru

KARIMOV Denis Olegovich, candidate of medical sciences, head of the department of toxicology and genetics with an experimental clinic for laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia. E-mail: karimovdo@gmail.com

KHUSNUTDINOVA Nadezhda Yuryevna, researcher, department of toxicology and genetics with experimental clinic for laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia. E-mail: h-n-yu@yandex.ru

REPINA Elvira Faridovna, candidate of medical sciences, senior researcher, department of toxicology and genetics with experimental clinic for laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia. E-mail: e.f.repina@bk.ru

VALOVA Yana Valerievna, junior researcher, department of toxicology and genetics with experimental clinic for laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia. E-mail: q.juk@ya.ru

MUHAMMADIEVA Guzel Fanisovna, candidate of biological sciences, senior researcher, department of toxicology and genetics with experimental clinic for laboratory animals, Ufa Research Institute of Occupational Medicine and Human Ecology, Ufa, Russia. E-mail: ufnimt@mail.ru

Корреспонденцию адресовать: ЯКУПОВА Татьяна Георгиевна, 450106, Россия, г. Уфа, ул. Степана Кувыкина, д. 94, ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека». Тел: 8 (3472) 55-19-57 E-mail: tanya.kutlina.92@mail.ru